

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 06 April 2000 (06.04.00)	
International application No.: PCT/JP99/05349	Applicant's or agent's file reference: PH-668-PCT
International filing date: 29 September 1999 (29.09.99)	Priority date: 29 September 1998 (29.09.98)
Applicant: SEIKI, Motoji	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

18 January 2000 (18.01.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:
 HIRAKI, Yusuke
 Toranomon No.5 Mori Building
 Third floor
 17-1, Toranomon 1-chome
 Minato-ku
 Tokyo 105-0001
 JAPON



Date of mailing (day/month/year)
 06 April 2000 (06.04.00)

Applicant's or agent's file reference
 PH-668-PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
 PCT/JP99/05349

International filing date (day/month/year)
 29 September 1999 (29.09.99)

Priority date (day/month/year)
 29 September 1998 (29.09.98)

Applicant
 SEIKI, Motoji

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
 AU,CN,IP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
 BG, BR, CA, CZ, EA, EP, HU, ID, IL, IN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, VN, ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
 06 April 2000 (06.04.00) under No. WO 00/18900

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

127
1028
Translation

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-668-PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP99/05349	International filing date (day/month/year) 29 September 1999 (29.09.99)	Priority date (day/month/year) 29 September 1998 (29.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/64, 1/21, 15/57, C12P 21/02, C12Q 1/37, A61K 38/57		
Applicant SEIKI, Motoji		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 January 2000 (18.01.00)	Date of completion of this report 04 April 2000 (04.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05349

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig. _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05349

IV. Lack of unity of invention**1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:**

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.**3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is**

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

IV. 3.

The requirement of unity of invention for an international application (PCT Rule 13.1) is satisfied only if there is a technical relationship among the inventions disclosed in the claims that involves one or more of the same or corresponding special technical features. Such a 'special technical feature' is a technical feature that clearly shows a contribution that the inventions disclosed in the claims, as a whole, make over prior art (PCT Rule 13.2). Moreover, the judgement on the requirement of unity of invention is made without considering whether the inventions are disclosed in separate claims or whether they are disclosed as alternatives within a single claim (PCT Rule 13.3).

Looking at the claims, it can be seen that the matter in common to the inventions of claims 1-4, 9, 11, 13-16 (in claim 13, the part that cites claims 9 and 11), 17 (the part that cites claims 1-4), 18, 20, 21 (the part that cites claims 18), 22 (the part that cites claims 1-4), 23, 25, 27, 29, 31 and 32 (the part that cites claims 1-4) is MT4-MMP(2), whereas the matter in common to the inventions of claims 5-8, 10, 12, 13-16 (in claim 13, the part that cites claims 10 and 12), 17 (the part that cites claims 5-8), 19, 20, 21 (the part that cites claims 19), 22 (the part that cites claims 5-8), 24, 26, 28, 30, 31 and 32 (the part that cites claims 5-8) is MT5-MMP. However it goes without saying that transmembrane matrix metalloprotease polypeptides (MT-MMPs) are publicly known, and so it is considered that there is no 'special technical feature' common to both the first group of inventions (those relating to MT4-MMP(2)) and the second group of inventions (those relating to MT5-MMP).

It is thus considered that the claims disclose two separate groups of inventions, namely (i) inventions relating to MT4-MMP(2), and (ii) inventions relating to MT5-MMP.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05349

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The subject matter of claims 1-32 is neither disclosed in any of the documents cited in the ISR, nor considered to be obvious to a specialist in the technical field in question on account of prior art (which includes said documents).

特許協力条約

PCT

EP US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-668-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP99/05349	国際出願日 (日.月.年) 29.09.99	優先日 (日.月.年) 29.09.98	
出願人(氏名又は名称) 清木 元治			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 出願人が示したとおりである. なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件（PCT規則13.1）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的関係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（PCT規則13.2）。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる（PCT規則13.3）。

そこで、請求の範囲をみると、請求の範囲1-4, 9, 11, 13-16（請求の範囲1

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N9/64, 1/21, 15/57, C12P21/02, C12Q1/37,
A61K38/57

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N9/02-9/94, 15/52-15/61

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Database MEDLINE on PubMed, Accession No. 99402951, Kajita, M. et al., "Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts.", FEBS Letters, Volume 457, Number 3, issued 3 September 1999, pages 353-356	1-32
A	Cancer Research, Volume 56, Number 5, issued 1 March 1996, Xose S. Puente et al., "Molecular Cloning of a Novel Membrane-type Matrix Metalloproteinase from a Human Breast Carcinoma", pages 944-949	1-32

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 24.12.99	国際調査報告の発送日 11.01.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田俊生 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 8214

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
P, A	Cancer Research, Volume 59, Number 11, issued 1 June 1999, Elena Llano et al., "Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-bound Activator of Pro-gelatinase A Overexpressed in Brain Tumors", pages 2570-2576	1-32
P, A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 274, Number 13, issued 26 March 1999, Duanging Pei, "Identification and Characterization of the Fifth Membrane-type Matrix Metalloproteinase MT5-MMP", pages 8925-8932	1-32
A	EP, 875577, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 4.11月.1998 (04.11.98) & US, 5837508, A & JP, 10-313878, A	1-32
A	WO, 97/04080, A1 (FUJI YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 6.2月.1997 (06.02.97) & JP, 9-84589, A & JP, 9-87299, A & EP, 870826, A1	1-32
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 272, Number 15, issued 11 April 1997, Ken-ichi Shofuda et al., "Expression of Three Membrane-type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Characterization of MT3-MMPs with and without Transmembrane Domain", pages 9749-9754	1-32
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 270, Number 39, issued 29 September 1995, Takahisa Takino et al., "Identification of the Second Membrane-type Matrix Metalloproteinase (MT-MMP-2) Gene from a Human Placenta cDNA Library", pages 23013-23020	1-32
A	WO, 95/25171, A2 (MAXDELBRUCK-CENTRUM FUR MOLUKULARE MEDIZIN) 21.9月.1995 (21.09.95) & DE, 4438838, C1 & EP, 750671, A1 & JP, 10-501962, A	1-32
A	European Journal of Biochemistry, Volume 231, Number 3, issued 1 August 1995, Horst Will et al., "cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment", pages 602-608	1-32

第II欄の続き

3で請求の範囲9, 11を引用した部分), 17(請求の範囲1-4を引用した部分), 18, 20及び21(請求の範囲18を引用した部分), 22(請求の範囲1-4を引用した部分), 23, 25, 27, 29, 31及び32(請求の範囲1-4を引用した部分)の発明に共通する事項は、MT4-MMP(2)であり、請求の範囲5-8, 10, 12, 13-16(請求の範囲13で請求の範囲10, 12を引用した部分), 17(請求の範囲5-8を引用した部分), 19, 20及び21(請求の範囲19を引用した部分), 22(請求の範囲5-8を引用した部分), 24, 26, 28, 30, 31及び32(請求の範囲5-8を引用した部分)の発明に共通する事項は、MT5-MMPである。しかしながら、膜貫通型マトリックスマタロプロテアーゼポリペプチド(MT-MMP)はいうまでもなく公知のものであるから、前者の各発明(MT4-MMP(2)に関連する発明)と後者の各発明(MT5-MMPに関連する発明)とに共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

そうすると、請求の範囲には、
① MT4-MMP(2)に関連する発明、及び、
② MT5-MMPに関連する発明
の2発明が包含されている。

REC'D 25 APR 2000

WIPO

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の審査記号 PH-668-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05349	国際出願日 (日.月.年) 29.09.99	優先日 (日.月.年) 29.09.98
国際特許分類 (IPC)	Int. C17 C12N9/64, 1/21, 15/57, C12P21/02, C12Q1/37, A61K38/57	
出願人（氏名又は名称） 清木元治		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.01.00	国際予備審査報告を作成した日 04.04.00
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 内田俊生印 電話番号 03-3581-1101 内線 3488
	4N 8214

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 _____ 項
 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

請求の範囲を減縮した。

追加手数料を納付した。

追加手数料の納付と共に異議を申立てた。

請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

満足する。

以下の理由により満足しない。

国際出願における発明の単一性の要件（PCT規則13.1）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的関係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（PCT規則13.2）。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる（PCT規則13.3）。

そこで、請求の範囲をみると、請求の範囲1-4, 9, 11, 13-16（請求の範囲13で請求の範囲9, 11を引用した部分）、17（請求の範囲1-4を引用した部分）、18, 20及び21（請求の範囲18を引用した部分）、22（請求の範囲1-4を引用した部分）、23, 25, 27, 29, 31及び32（請求の範囲1-4を引用した部分）の発明に共通する事項は、MT4-MMP（2）であり、請求の範囲5-8, 10, 12, 13-16（請求の範囲13で請求の範囲10, 12を引用した部分）、17（請求の範囲5-8を引用した部分）、19, 20及び21（請求の範囲19を引用した部分）、22（請求の範囲5-8を引用した部分）、24, 26, 28, 30, 31及び32（請求の範囲5-8を引用した部分）の発明に共通する事項は、MT5-MMPである。しかしながら、膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド（MT-MMP）はいうまでもなく公知のものであるから、前者の各発明（MT4-MMP（2）に関連する発明）と後者の各発明（MT5-MMPに関連する発明）とに共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

そうすると、請求の範囲には、①MT4-MMP（2）に関連する発明、及び、②MT5-MMPに関連する発明、の2発明が含まれている。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

すべての部分

請求の範囲 _____ に関する部分

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N) 請求の範囲 1 - 32 有
請求の範囲 _____ 無

進歩性 (I S) 請求の範囲 1 - 32 有
請求の範囲 _____ 無

産業上の利用可能性 (I A) 請求の範囲 1 - 32 有
請求の範囲 _____ 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1 - 32 に記載されている発明は、国際調査報告で引用されたいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当該技術分野の専門家にとってそれらの文献を含む先行技術からみて自明のものでもない。

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12N 9/64, 1/21, 15/57, C12P 21/02, C12Q 1/37, A61K 38/57	A1	(11) 国際公開番号 WO00/18900 (43) 国際公開日 2000年4月6日(06.04.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05349		
(22) 国際出願日 1999年9月29日(29.09.99)		
(30) 優先権データ 特願平10/276258 特願平10/291505	1998年9月29日(29.09.98) 1998年9月29日(29.09.98)	JP JP
(71) 出願人；および (72) 発明者 清木元治(SEIKI, Motoji)[JP/JP] 〒142-0061 東京都品川区小山台2-5 小山台住宅5-203 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(74) 代理人 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)		

(54)Title: DNAS ENCODING NOVEL POLYPEPTIDES

(54)発明の名称 新規ポリペプチドをコードするDNA

(57) Abstract

A novel transmembrane matrix metalloprotease polypeptide [MT4-MMP(2)] having a physiological activity different from MT4-MMP reported hitherto; a DNA encoding this metalloprotease polypeptide; a process for producing the metalloprotease polypeptide; and a method for screening an inhibitor, an activator, etc. by using the above metalloprotease polypeptide and DNA. Novel human and mouse transmembrane matrix metalloprotease polypeptides [MT5-MMP] having a physiological activity; DNAs encoding these metalloprotease polypeptides; a process for producing these metalloprotease polypeptides; and a method for screening an inhibitor, an activator, etc. by using the above metalloprotease polypeptides and DNAs.

本発明は、従来報告されているMT4-MMPとは異なり、生理的に活性を持つ新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド(MT4-MMP(2))、該メタロプロテアーゼポリペプチドをコードするDNA、該メタロプロテアーゼポリペプチドの製造法および該メタロプロテアーゼポリペプチドおよびDNAを用いた阻害薬や活性化薬スクリーニング法等を提供する。

また、本発明は、生理的に活性を持ったヒトおよびマウスの新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド(MT5-MMP)、該メタロプロテアーゼポリペプチドをコードするDNA、該メタロプロテアーゼポリペプチドの製造法および該メタロプロテアーゼポリペプチドおよびDNAを用いた阻害薬や活性化薬スクリーニング法等を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルガリア・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モaco	TG トーゴー
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドavia	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルコメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダッド・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジエール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーロースラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明細書

新規ポリペプチドをコードするDNA

技術分野

本発明は、新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ポリペプチドの製造方法に関する。更に、該ポリペプチドもしくはその一部又はそれらを発現した微生物もしくは動物細胞を利用した阻害薬または活性化薬を探索する方法および該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する化合物を探索する方法に関する。

背景技術

コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン等の複雑な成分から構成される細胞外マトリックスの分解には、金属イオンを活性中心に持つマトリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素（以下MMPsと略記する）が関与している。

これまでMMPsとしては、間質型コラゲナーゼ（MMP-1）、ゼラチナーゼA（MMP-2）、ゼラチナーゼB（MMP-9）、ストロメライシン1（MMP-3）、マトリライシン（MMP-7）、好中球コラゲナーゼ（MMP-8）、ストロメライシン2（MMP-10）、ストロメライシン3（MMP-11）、メタロエラスターーゼ（MMP-12）、コラゲナーゼ3（MMP-13）、膜貫通型MMP-1（MT1-MMPまたはMMP-14）、膜貫通型MMP-2（MT2-MMPまたはMMP-15）、膜貫通型MMP-3（MT3-MMPまたはMMP-16）、膜貫通型MMP-4（MT4-MMPまたはMMP-17）等が報告されている〔蛋白質核酸酵素, 42, 2386 (1997)〕。これらのMMPsはファミリーを形成し、各MMPは基本的にN-末端プロペプチドドメイン、亜鉛イオンが結合する活性ドメイン、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインの3つから構成されている。MMP-7においてはヘモペキシン凝血酵素様ドメインはない。膜貫通型では、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインのC-末端に膜貫通ドメインと、細胞内ドメイ

ンを持っている。

ヒトMT 4-MMP遺伝子は既に報告されているが(Puente: Cancer Research, 56, 944 (1996))、該遺伝子の塩基配列には翻訳開始領域が含まれておらず、単にMMPに類似したドメイン領域を有する塩基配列を含んでいるとして定義された遺伝子である。従って、該遺伝子はMT 4-MMP完全長をコードしているとは考えにくい。

一方、変形性関節症の患者においてMT 1-MMPの産生が促進されていること(Am. J. Pathol, 151, 245 (1997))、免疫や炎症反応に重要な白血球の組織への浸潤にMMPが重要なこと(J. Immunol., 156, 1 (1996))、MMP阻害薬が肝炎を予防すること(Eur. J. Pharmacol, 341, 105 (1998))、MMP阻害薬が角膜潰瘍の治療(日本眼科学会誌, 102, 270 (1998))に有効であること等が知られている。

また、癌の増殖、浸潤、転移にMMPが重要であることが知られており(蛋白質核酸酵素, 42, 2386 (1997))、MMP阻害薬が制癌活性をもつことが報告されている(SCRIP, 2349, 20 (1998))。

更に、MT 4-MMPは白血球に発現して、白血球の遊走と浸潤に関係があることが示唆されている。

以上のことから、MMPは変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、睥炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症を診断する指標となるとともに、その阻害薬はこれらの疾患の予防と治療に用いることができる。

既に報告されているMT 4-MMP(Cancer Research, 56, 944 (1996))は、転写開始点を含まず、従来知られているMT 1-MMP等の膜貫通型MMPに見られるようなドメイン構造を持っていないため、生体内では発現していない非生理的なペプチドをコードした配列である。

本発明は、従来報告されているMT 4-MMPとは異なり、生理的に活性を持った新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド(以下、MT 4-MMP(2)と略すこともある)、該メタロプロテアーゼポリペプチドをコード

するDNA、該メタロプロテアーゼポリペプチドの製造法および該メタロプロテアーゼポリペプチドおよびDNAを用いた阻害薬や活性化薬スクリーニング法等を提供する。

また、本発明は、生理的に活性を持ったヒトおよびマウスの新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド〔以下、MT 5-MMPと略す〕、該メタロプロテアーゼポリペプチドをコードするDNA、該メタロプロテアーゼポリペプチドの製造法および該メタロプロテアーゼポリペプチドおよびDNAを用いた阻害薬や活性化薬スクリーニング法等を提供する。

発明の開示

本発明者は、既知のヒトMT 4-MMPは本来の活性を有する蛋白質ではなく、活性を有する真のMT 4-MMPが存在するとの推測の基に鋭意検討を行い、本発明を完成するに至った。

また、本発明者は、医薬用途として有用と考えられている既知の膜貫通型MMP以外にも、有用な新規膜貫通型MMPが存在するとの推測の基に鋭意検討を行い、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下(1)～(32)に関する。

- (1) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (2) 上記(1)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
- (3) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (4) 上記(3)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

上記(2)及び(4)のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1もしくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換もしくは付加できる

程度の数のアミノ酸を意味する。

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ1～38と略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817(1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

- (5) 配列番号5記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (6) 上記(5)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
- (7) 配列番号6記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (8) 上記(7)記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
- (9) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNA。
- (10) 上記(5)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNA。
- (11) 配列番号3の86～1846番または配列番号4の100～1917番に記載の塩基配列からなるDNAまたは該DNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

上記において「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、

配列番号3の86～1846番または配列番号4の100～1917番に記載の塩基配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 mol/LのNaCl存在下、65°Cでハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L 塩化ナトリウム、15 mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、65°C条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラークローニング 第2版、カレントプロトコル イン モレキュラバイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号3の86～1846番または配列番号4の100～1917番に記載の塩基配列と少なくとも80%以上の相同意を有するDNA、好ましくは95%以上の相同意を有するDNAをあげることができる。

(12) 配列番号7の75～1928番または配列番号8の1～1935番に記載の塩基配列からなるDNAまたは該DNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

上記において「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、配列番号7の75～1928番または配列番号8の1～1935番に記載の塩基配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 mol/LのNaCl存在下、65°Cでハイブリダイゼーションを行った後、

0. 1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L 塩化ナトリウム、15 mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号7の75～1928番または配列番号8の1～1935番に記載の塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

(13) 上記(9)から(12)のいずれかに記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(14) 上記(13)記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(15) 形質転換体がEscherichia属に属する微生物である、上記(14)記載の形質転換体。

(16) Escherichia属に属する微生物がEscherichia coliである、上記(15)記載の形質転換体。

(17) 上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(18) 上記(9)または(11)のいずれかに記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(19) 上記(10)または(12)のいずれかに記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(20) 上記(18)または(19)に記載のオリゴヌクレオチドを用いて上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出

する方法。

- (21) 上記(18)または(19)に記載のオリゴヌクレオチドを用いて上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。
- (22) 上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現する細胞を用いることを特徴とする、該ポリペプチドの阻害薬または活性化薬のスクリーニング法。
- (23) 上記(1)から(4)のいずれかに記載のポリペプチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。
- (24) 上記(5)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。
- (25) 上記(9)または(11)記載のDNAを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。
- (26) 上記(10)または(12)記載のDNAを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。
- (27) 上記(18)記載のオリゴヌクレオチドを含有する変形性関節症、慢性

関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、睥炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

(28) 上記(19)記載のオリゴヌクレオチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、睥炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

(29) 上記(9)または(11)のDNA、または上記(18)記載のオリゴヌクレオチドをベクターに組み込んで得られる、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、睥炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の治療のための遺伝子治療用ベクター。

(30) 上記(10)または(12)のDNA、または上記(19)記載のオリゴヌクレオチドをベクターに組み込んで得られる、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、睥炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍のための遺伝子治療用ベクター。

(31) 上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング法。

(32) 遺伝子の発現を調節する化合物を、上記(1)から(8)のいずれかに記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することにより検出すること

を特徴とする、上記（31）記載のスクリーニング法。

図面の簡単な説明

図1は、ヒトMT5-MMPとマウスMT5-MMPのアミノ酸配列とヒトMT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMPならびにヒトMT4-MMP(2)のアミノ酸配列を比較した図である。

*の部分は一致しているアミノ酸残基を示す。

.の部分は類似しているアミノ酸残基を示す。

(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

ここで、kbはキロ塩基対 (kilobase pairs)を表す。

図2は、各々の濃度でマウスMT5-MMP部分ペプチド（プロペプチドドメイン+活性ドメイン、図中MT5△C）をpro-MMP-2と反応させ、pro-MMP2を切断して活性化する能力を調べた結果を示した図である。

ポジティブコントロールとしてAPMAを用いた。その結果、MMP濃度依存的に活性化が認められた。図中「Active」は活性化されたMMP-2を示す。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

〔1〕本発明の新規マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドをコードするDNAの取得

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジンートリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

全RNAからポリ(A) mRNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ

(dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー クローニング 第2版) やオリゴdTラテックスを用いる方法 [細胞光学 別冊8「新細胞光学実験プロトコール」秀潤社48-52頁、Nucleic Acids Res., Symposium Series, 19, 61(1988)] 等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit ; インビトロジエン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit ; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

適切な細胞または組織として、MT4-MMP (2) の場合には、データベースから見出されたMT4-MMPをコードするDNAのEST等が含まれていたcDNAライブラリーの種類を調べ、該ライブラリーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。また、MT5-MMPの場合には、適切な細胞または組織として、脳や腎臓など組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

得られた全RNAあるいはmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版やカレント プロトコールズ1~38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning ; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップーcDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit, ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

cDNAライブラリーを作成するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株内で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda

ZAP II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 (DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985))、 λ TriplEx (クローンテック社製)、 λ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 (Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983))、pUC18 (Gene, 33, 103 (1985))、pAMo (J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)) 等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌Escherichia coliに属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' (ストラタジーン社製、Strategies 5, 81 (1992))、Escherichia coli C600 (Genetics, 39, 440 (1954))、Escherichia coli Y1088 (Science, 222, 778 (1983))、Escherichia coli Y1090 (Science, 222, 778 (1983))、Escherichia coli NM522 (J. Mol. Biol., 166, 1 (1983))、Escherichia coli K802 (J. Mol. Biol., 16, 118 (1966))、Escherichia coli JM105 (Gene, 38, 275 (1985))、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392(モレキュラー クローニング 第2版) 等を用いることができる。

上記方法により作製したcDNAライブラリーに加え、市販のcDNAライブラリーも利用することができる。

市販のcDNAライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器cDNAライブラリーをあげることができる。

(2) 本発明のDNAの取得

上記(1)で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNAを有するcDNAクローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブラーク・ハイブリダイゼーション法(モレキュラー クローニング 第2版)等により選択することができる。

プローブとしては、MT4-MMP(2)の場合には、一部明らかになっているMT4-MMPをコードするDNAの塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。また、MT5-MMPの場合には、MT3-MMPをコ

ードするDNAの塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

上記方法により得られた、目的とするクローンより、上述の方法でmRNAを取得し、cDNAを合成する。

該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE(rapid amplification of cDNA ends)および3'-RACE [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)]により、プライマーに用いた配列よりも5'端側および3'端側のcDNA断片を得ることができる。

得られたcDNA断片をつなぎあわせることにより全長のcDNAを取得することができる。

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジテオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]あるいはバーキン・エルマー社 (Perkin Elmer : 373A・DNAシークエンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子の塩基配列を決定するためには、通常の染色体DNAクローニング法を用いることができる(モレキュラークローニング 第2版)。

即ち、本発明のポリペプチドを発現している細胞、すなわちMT4-MMP(2)の場合には例えばモノサイト系のTHP-1細胞等、MT5-MMPの場合には例えば脳や腎臓等の染色体DNAを制限酵素で消化し、該切断断片を通常のプラスミドベクターまたはファージベクターを用いてクローニングし、ゲノムライブラーを作製する。

上記において取得され、塩基配列の決定されたDNA断片をプローブとして用い、上記のcDNAクローニングで用いた方法と同様の方法で該ゲノムライブラーをスクリーニングすることにより、本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子を有するクローンを取得することができる。

該クローンを用いて、上述の方法によりゲノム遺伝子の塩基配列を決定するこ

とができる。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とするDNAを取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 1392等をあげることができる。

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ(FrameSearch)などの相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Protなどのアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

該方法により確認された新規な塩基配列を有する本発明のポリペプチドであるMT4-MMP(2)をコードするDNAとして、例えば、配列番号3または配列番号4で表される配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号3で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはpMMT4/pBSSKを、配列番号4で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはphMT4/pBSIIKSをあげることができる。

プラスミドpMMT4/pBSSKを含有する大腸菌Escherichia coli pMMT4/pBSSKは、FERM BP-6528として、プラスミドphMT4/pBSIIKSを含有する大腸菌Escherichia coli phMT4/pBSIIKSは、FERM BP-6530として平成10年9月25日付で工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)に寄託されている。

また、上記方法により確認された新規な塩基配列を有する本発明のMT5-MMPポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、配列番号7または配列番号8で表される配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号7で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはpmMT5/pBSSKを、配列番号8で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはphMT5/pGEMをあげることができる。

プラスミドpmMT5/pBSSKを含有する大腸菌 Escherichia coli pmMT5/pBSSKは、FERM BP-6529として、プラスミドphMT5/pGEMを含有する大腸菌 Escherichia coli phMT5/pGEMは、FERM BP-6531として平成10年9月25日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）に寄託されている。

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいは上記記載のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連續した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、MT4-MMP(2)の場合には、配列番号3または4で表される塩基配列中の連續した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。また、MT5-MMPの場合には、配列番号7または8で表される塩基配列中の連續した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度(T_m)および塩基数が極端に変わることのない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'～P5'ホスフォアミデ

ート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

[2] 本発明のマトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記〔1〕に記載の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させるためには、モレキュラークローニング 第2版やカレントプロトコルズ1~38等に記載された方法を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモータ下流に挿入した組換えベクターを作成し、それを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中の組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列より構成された組換えベクタ

一であることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pKK233-2 (ファルマシア社製)、pSE280 (インピトロジエン社製)、pGEMEX-1 (プロメガ(Promega)社製)、pQE-8 (キアゲン(QIAGEN)社製)、pKYP10 (特開昭 58-110600)、pKYP200 (Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984))、pLSA1 (Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989))、pGEL1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985))、pBluescript II SK(-) (ストラタジーン社製)、pGEX (ファルマシア社製)、pET-3 (ノバジェン社製) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター (P_{trp})、lac プロモーター、PL プロモーター、PR プロモーター、T7 プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01 プロモーター、SP02 プロモーター、penP プロモーター等をあげることができる。また P_{trp} を 2 つ直列させたプロモーター (P_{trp} × 2)、tac プロモーター、lacT7 プロモーター、let I プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6 ~ 18 塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシエリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium

saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法(Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979))等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものも用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスporon属、シワニオミセス属、ピヒア等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法(Methods in Enzymology, 194, 182 (1990))、スフェロプラスト法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984))、酢酸リチウム法(Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983))等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE107(特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990))、pAS3-3(特開平2-227075)、

pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)], pCDNA1/Amp (インビトロジエン社製)、pREP4 (インビトロジエン社製)、pAGE103 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)] 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、HEK293 細胞 (ATCC: CRL-1573)、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)] 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコルズ 1 ~ 38、Bio Technology, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジエン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができ

る。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual (1992))、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)) 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー クローニング第 2 版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、本発明のポリペプチドを発現する適切な発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

(2) 形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分

解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパンノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーブリカーカゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～

7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (ファーミンジエン (Pharmingen) 社製)、Sf-900 II SFM 培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405 [いずれも JRH バイオサイエンシーズ (JRH Biosciences) 社製]、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962)) 等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6~7、25~30°C 等の条件下で 1~5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、Q-セファロース、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティーコロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細

胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釀、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞上に発現された場合には、培養細胞の膜画分を界面活性化剤で溶解して可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスト・ケムテック (Advanced ChemTech) 社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント (Protein Technology Instrument) 社、シンセセル・ベガ (Synthecell-Vega) 社、パーセプティブ (PerSeptive) 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

〔3〕本発明のポリペプチドの生物活性の検出

上記〔2〕に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性は、ペプチドまたは蛋白質の分解物を電気泳動またはカラムクロマトグラフィーを用いて測定するか、または蛍光標識あるいはアイソトープ標識したペプチドまたは蛋白質の分解で測定する。ペプチドが切断されることで活性化される酵素の活性化状態を測定することでも検出可能である。ゼラチンザイモグラフィーに用いられるのと同様に、該酵素によって分解されるペプチドを含むゲルを用い

ても測定できる。

[4] 本発明のポリペプチドの阻害薬または活性化薬の探索および同定

本発明のポリペプチドについて [2] 記載の方法で本発明のポリペプチドを発現させた細胞、[2]記載の方法で調製した本発明のポリペプチド発現大腸菌から [2] に記載した方法で精製した本発明のポリペプチドに被験試料を添加する。

被験試料の添加の有無における、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を比較することにより、被験試料の中からプロテアーゼ活性を増強する物質（活性化薬）および阻害する物質（阻害薬）をスクリーニングすることができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物（例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等）の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

被験試料としてペプチドを用いる場合、ランダムペプチドライブラリーを利用することができる。ランダムペプチドライブラリーとしては、ファージ上のペプチドシステム（peptides on phage）[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6378 (1990); PCT 特許出願番号 96/40189]、プラスミド上のペプチドシステム（peptides on plasmids）（米国出願特許番号 5,270,170; 米国出願特許番号 5,338,665）があげられる。

また、本発明のMT 4-MMP (2) に結合するペプチドは、ランダムペプチドライブラリーを利用してスクリーニングすることにより取得できる。ランダムペプチドライブラリーとしては、ファージ上のペプチドシステム（peptides on phage）[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6378 (1990); PCT 特許出願番号 96/40189]、プラスミド上のペプチドシステム（peptides on plasmids）（米国出願特許番号 5,270,170; 米国出願特許番号 5,338,665）があげられる。

[5] 本発明のDNA、ポリペプチドの利用

(1) 本発明のDNAは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織やヒト由來の細胞から[1] (2)と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

また、本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトの組織やヒト由來の細胞から[1] (2)と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR [reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990)]を行うことによってもmRNAの検出や定量を行うことができる。これらの該ポリペプチドmRNA定量法は本遺伝子が関与する病態の診断に用いることができる。

各種病態モデル動物における該ポリペプチドmRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該ポリペプチドmRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(2) 本発明のDNAあるいは該DNAの一部の塩基配列と同じ塩基配列または相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織切片に対して *in situ*ハイブリダイゼーション [Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)] をを行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等のより細かい発現分布を知ることができる。

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかという情報や、細胞がどのような刺激を受けたときに発現量が変化するかという情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するのに役立つ。

(3) 本発明のDNAをプローブとして、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション (モレキュラー クローニング 第2版) をを行うことにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出することができる。変異の検出を行うことにより、該遺伝子の変異が原因となっている可能性のある疾患の診

断を行うことができる。具体的には、MT 4-MMP (2) の場合には、例えば、变形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの疾患の診断を行うことができ、MT 5-MMP の場合には、例えば、变形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの疾患の診断を行うことができる。

(4) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(RNA/DNA)は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより [化学 46, 681 (1991)、Bio Technology, 9, 358 (1992)]、該遺伝子が発症に関与している可能性のある治療あるいは予防などへの応用も期待される。こうした疾患として、MT 4-MMP (2) の場合には、例えば变形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症があげられ、MT 5-MMP の場合には、例えば变形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症が挙げられる。

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAの一部の塩基配列、好ましくは翻訳開始領域にある1-0～50塩基と相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

本発明のDNAを含有する医薬は、本発明のポリペプチドに代えて本発明のDNAを用いる以外は、下記に示した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様な方法を用いて調製または投与される。

(5) 本発明のDNAを用い、[2]記載の方法により本発明のポリペプチドを取

得することができる。

本発明のポリペプチドの用途としては、MT 4-MMP (2) の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの診断薬、治療薬または予防薬が考えられる。また、MT 5-MMP の場合には、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの診断薬、治療薬または予防薬が考えられる。

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、診断薬または治療薬として該ポリペプチド単独で投与することも可能ではあるが、通常は該ポリペプチドを薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、貯蔵のため凍結乾燥し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることができる。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、通常は非経口経路、例えば皮下、筋肉内、静脈内、気道内等の投与経路が用いられる。

(6) 本発明のDNA (センスDNAまたはアンチセンスDNA) またはこれらの塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドは一本鎖または三本鎖としてレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとし、遺伝子治療に用いることができる。

実 施 例

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例 1 マウスMT 4 - MMP 関連蛋白 [MT 4 - MMP (2)] 遺伝子のクローニング

MT 4 - MMP 遺伝子はヒトの脳で高発現していることから、マウス 17 日胚の脳 cDNA ライブライリーを ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene) を用い、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

ヒト MT 4 - MMP 遺伝子の部分配列 ((配列番号 17 の 233 - 1899) をプローブとして用い、上記 cDNA ライブライリーのスクリーニングをブラークハイブリダイゼーション法により行った。

該スクリーニングにより上記プローブとハイブリダイズする陽性クローンの数種について塩基配列を解析した。解析したクローンは全て報告されたヒト MT 4 - MMP 遺伝子において欠落していると思われるシグナルペプチド配列部分を含んでおり、最長のクローンは 3.5 kb であった。従って、マウスでは 587 アミノ酸の配列番号 1 に記載した MT 4 - MMP (2) を発現できる配列番号 3 に記載した DNA に対応する mRNA が発現していると考えられた。

実施例 2 ヒトMT 4 - MMP (2) 遺伝子のクローニング

ヒト MT 4 - MMP 遺伝子に関する EST クローンをデータベースで調べたが、上記マウスで見られたようなシグナルペプチドをコードする部分を含むクローンの登録はなかった。従って、ヒト MT 4 - MMP 遺伝子において分泌型のヒト MT 4 - MMP 遺伝子は存在しないか、あるいは単離するには困難な理由があると思われた。

実施例 1 で取得したマウス MT 4 - MMP (2) 遺伝子のシグナルペプチドに相当する N 末の部分をコードする配列をプローブとしてヒト脳 cDNA ライブライリー (クロンテック社製) をスクリーニングしたが、相当する遺伝子の単離はできなかった。そこで 5' RACE 法にて転写産物の 5' 領域の解析を行った。細胞は MT 4 - MMP mRNA の発現が確認された単核球由来の THP-1 (ATCC

TIB-202、American Type Culture Collection) 細胞を用いた。

即ち、ヒトT H P - 1 細胞から単離した poly(A)+ RNA とヒトMT 4 - MMP 選択的なプライマー(配列番号9)を使用して superscript II(ギブコBRL社製)でc DNAを作成した。得られたc DNAに単一鎖のオリゴヌクレオチドアダプター(配列番号10)をT 4 RNAリガーゼでつなぎ、MT 4 - MMP選択的なプライマー(配列番号9)とアダプター選択的なプライマー(配列番号11)でGC緩衝液とLA Taq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCR後、遺伝子選択的な他のプライマー(配列番号12)とアダプター選択的なプライマー(配列番号13)を用いてPCRを行った。

50個のクローンを解析した結果、3個はMT 4 - MMPの配列を含むc DNA断片であったが、47個はマウスMT 4 - MMP(2)に類似するシグナルペプチド配列をコードするc DNA断片であった。このことにより、既に明らかになっているプロペプチド配列の下流部分に加えて、シグナルペプチドを含む配列番号2に示すヒトMT 4 - MMP(2)をコードする配列番号4に示すm RNAの全量域が明らかとなった。ESTクローンのH97792クローンの遺伝子配列はPuenteにより報告されたMT 4 - MMP [Cancer Research, 56, 944 (1996):配列番号17]とほとんど同一であったが、触媒領域の配列の一部が異なっており、ESTクローンH97792の方がマウスMT 4 - MMP(2)との保存性が高かった。全配列を新たに決定したところ、Puenteにより報告されたMT 4 - MMPの既に明らかになっている部分においても、MT 4 - MMP(2)は配列の異なる部分が見られた。

マウスおよびヒトMT 4 - MMP(2)は相互によく保存されており、プロペプチド、触媒、ヒンジ、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインの各ドメインはそれぞれ87、87、78、96%のホモロジーを有していた。シダナルペプチドと膜貫通部位比較的類似性が低く54と35%であった。また、触媒ドメインのヒトMT 4 - MMP(2)とMT 1 - MMP, MT 2 - MMP, MT 3 - MMPの間との比較は、それぞれ、36、39、31%であった。このことからも、マウスMT 4 - MMP(2)はヒトMT 4 - MMP(2)に最も近く、ヒトMT 4 - MMP(2)のマウスホモログであると結論された。

実施例3 MT 4 - MMP (2) の発現と遺伝子産物の検出

単離した cDNA から確かに遺伝子産物が翻訳されることを確認するために、cDNA を SV40 プロモーターを持つ pSG5 ベクター（ストラタジーン社製）に組み込んだ。発現した産物の検出のために、潜在型酵素のプロセッシング部位の下流に FLAG 配列（イーストマンケミカル社製）を組み込むことにより、抗 FLAG 抗体による検出を可能とした。

COS-1 細胞にマウスおよびヒトの MT 4 - MMP (2) の発現プラスミドをトランسفエクションし、48 時間後に採取した細胞を溶解して、ウエスタン法によって FLAG 標識 MT 4 - MMP の検出を行った。抗 FLAG 抗体 M2（イーストマンケミカル社製）によってとともに、発現プラスミドをトランسفエクションした細胞に特異的な 66 kDa のバンドが検出された。

実施例4 MT 4 - MMP の転写産物の検出および解析

MT 4 - MMP 転写産物は 5' 端に Alu 配列を持つことから、インtron を含んでいる可能性があったため、ヒト MT 4 - MMP (2) 遺伝子の部分配列（配列番号 4 の 212 ~ 519 番目）に示した部分をプローブとして用い、ヒューマンサイエンス研究資源バンクのライプラリー（Deposit > No. LI020）よりハイブリダイゼーション法により、ハイブリダイズするクローニングを単離して、該クローニングよりプラスミドを常法により抽出し、該プラスミドに含有される MT 4 - MMP の 5' 末端付近の塩基配列（配列番号 17 の 140 ~ 272 番）の周辺の遺伝子配列を調べた。

MT 4 - MMP と MT 4 - MMP (2) 遺伝子を比較した時に、相同性が無くなる領域の MT 4 - MMP 遺伝子配列（配列番号 17 の 1 ~ 139 番）はゲノム配列（配列番号 18）の 3008 ~ 3147 番にほぼ一致し、その境界にはスプライシングドナー配列が存在した。MT 4 - MMP のエクソンコードする配列（配列番号 17 の 140 ~ 340 番）はゲノムの配列（配列番号 18）の 3148 ~ 3280 番及び 3564 ~ 3633 番にほぼ一致した。以上の結果から、第一インtron を残した転写産物が MT 4 - MMP であると結論された。

以上の結果から、ヒトではMT4-MMPとMT4-MMP(2)の2種類のmRNAが発現していると考えられた。

これら2種類の転写産物をそれぞれRT-PCRによって識別するために、それぞれに特異的な5'領域のプライマー(MT4-MMP:配列番号14, MT4-MMP(2):配列番号15)と共通の3'プライマー(配列番号16)を作成した。

これら転写産物の各種癌細胞における発現を表1に示した。

表1 MT4-MMP(2)およびMT4-MMPの転写産物の癌細胞での発現

癌細胞株	MT4-MMP(2)	MT4-MMP	寄託番号
Jurkat (T cell)	++	+/-	ATCC TIB-152
Raji(B cell)	-	-	ATCC CCL-86
BJAB(B cell)	-	-	ATCC HB-136
THP-1(monocytic)	++	+	ATCC TIB-202
K562(monocytic)	++	-	ATCC CCL-243
U-937(monocytic)	++	-	ATCC CRL-1593.2
U-251 MG(astrocytoma)	++	-	発酵研 IF050288
SK-N-SH(neuroblastoma)	++	-	ATCC HTB-11
no.10(glioma)	+/-	-	発酵研 IF050368
KALS-1(glioma)	++	-	発酵研 IF050434
MKN-7(gastric)	+	-	理化研 RCB0999
MKN-28(gastric)	-	-	理化研 RCB1000
NUGC-4(gastric)	+	-	HS財団 JCRB0834
PANC-1(pancreatic)	++	+	ATCC CRL-1469
MIA PaCa-2(pancreatic)	++	+/-	ATCC CRL-1420
SK-HEP-1(hepatoma)	++	+	ATCC HTB-52
Hep 3B(hepatoma)	++	+	ATCC HB-8064
ZR-75-1(breast)	++	+	ATCC CRL-1500
MCF7(adenocarcinoma)	++	+	ATCC HTB-22
T-24(bladder)	++	+	ATCC HTB-4
A375(melanoma)	++	+	ATCC CRL-1619
HT-1080(fibrosarcoma)	+	-	ATCC CCL-121

++:強発現、+:中程度の発現、+/-:少量発現、-:発現無し

ATCC: American Type Culture Collection

HS財団:財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

理化研:特殊法人理化学研究所

発酵研:財団法人発酵研究所

MT4-MMPはMT4-MMP(2)の発現が認められる細胞でだけ発現し

ていた。

以上の結果から、MT 4 - MMP (2) が主たる転写産物であるが、細胞によつては類似した転写制御下にMT 4 - MMPの発現が起こっていると考えられる。

実施例 5 マウス組織におけるMT 4 - MMP (2) の発現

4週齢のマウスの組織を臓器ごとに切除してRNAを抽出してMT 4 - MMP (2) の発現パターンを調べた。20 μg の全RNAを1%アガロースゲルで泳動しナイロンメンブレンに転写して³²Pで標識したマウスMT 4 - MMP (2) 遺伝子をプローブに用いてノーザンプロッティングを行い、MT 4 - MMP (2) の発現パターンを調べた。

特に発現の高い臓器は大脳、小脳、脳幹、大腸、子宮、睪丸であった。副腎、乳腺、胎盤ではほとんど発現は認められなかつた。マウスでの発現結果はPuenteらによるヒト組織での報告 [Cancer Research, 56, 944 (1996)] と一致した。

マウスの各臓器でのMT 4 - MMP (2) の発現は脳で非常に高く、他に大腸、子宮、睪丸など限定された組織での発現が見られ、MT 1 - MMP, MT 2 - MMPが比較的広範な組織での発現を示すのに対して特徴的であった。このことから、MT 4 - MMP (2) が発現臓器に特異的な細胞外基質の分解を介して、組織の恒常性維持に関与していると考えられる。

実施例 6 マウスMT4-MMP (2)部分ペプチド(ヘモペキシン凝血酵素様ドメイン)の大腸菌での発現

配列番号1の321～550番目に示されるアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基の付加した配列を有するマウスMT4-MMP (2)部分ペプチド(ヘモペキシン凝血酵素様ドメイン)をコードするcDNAを、マウスMT4-MMP (2)のcDNAを鋳型として用いポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法で増幅した。

得られた増幅断片を大腸菌の発現ベクターであるpET3a(宝酒造社製)にサブクローニングして、さらに大腸菌株BL21(DE3)pLysS(宝酒造社製)に導入した。該大腸菌を100 μg/mLのアンピシリン存在下、1Lの発現用培地でOD₆₀₀が0.5になるまで培養して、0.4 mmol/Lのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド

(IPTG) で刺激後さらに3時間培養した。

培養後、常法に基づいて大腸菌内に形成されたマウスMT4-MMP (2) 部分ペプチドよりなる顆粒 (inclusion body) を取得し、8 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6) および20 mmol/L ジチオスレイトール (DTT) を含む可溶化液に溶解した。該溶解液をHigh Q anion exchange columnにアプライし、0.2 mol/L 塩化ナトリウム溶出フラクションを回収した。

該フラクションを 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.6)、6mol/L 尿素、1 mmol/L ジチオスレイトール、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、100 mmol/L 塩化亜鉛、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液で希釈し、該希釈液にシスタミン (最終濃度 20 mmol/L) を加えた。次いで、50 mmol/L Tris-HCl (pH8.6)、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、100 mmol/L 塩化亜鉛、5 mmol/L β メルカプトエタノール、1 mmol/L 2-ヒドロキシエチルジスルフィド、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液を用い、4°Cで透析した。さらに、10倍量の 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、50 mmol/L 塩化亜鉛、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液で透析した (4時間×3回)。この溶液を 22000 xg、4°C、10分間遠心分離し、沈殿を除いた。

得られた上清を 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、150 mmol/L 塩化ナトリウム、10 mmol/L 塩化カルシウムおよび 0.02% アジ化ナトリウムを含む緩衝液で平衡化した S-200 カラムクロマトグラフィーに通塔し、ゲルろ過を行い、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインに相当するマウス MT4-MMP (2) 部分ペプチドを取得した。

実施例7 ヒトMT4-MMP (2) 部分ペプチド (プロペプチドドメイン+活性ドメイン) の大腸菌での発現

配列番号2の58~298番目に示されるアミノ酸配列を有するヒトMT4-MMP部分ペプチドをコードするcDNAを、ヒトMT4-MMP (2) のcDNAを鑄型として用いポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で増幅した。

得られた増幅断片を大腸菌の発現ベクターであるpRSET (Invitrogen製) にサブクローニングした。発現酵素はpRSET由来のリーダー配列中にある6 x His配列と

のフュージョンタンパクとして発現した。さらにそのベクターを大腸菌株 BL21(DE3) pLysS (宝酒造社製) に導入した。該大腸菌を $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ のアンピシリン存在下、1 Lの発現用培地 (トリプトン12g/L、イーストエクストラクト24g/L、塩化ナトリウム 10g/L、トリスマベース250mg/L、グリセロール4mL/L) で OD_{600} が0.5になるまで培養して、0.4 mmol/Lのイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) で刺激後さらに3時間培養した。

培養後、常法に基づいて大腸菌内に形成されたヒトMT4-MMP (2) 部分ペプチド (プロペプチドドメイン+活性ドメイン) よりなる顆粒 (inclusion body) を取得し、8 mol/L尿素、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6) を含む可溶化液に溶解した。該溶解液をニッケルキレートカラムにアプライし、250 mmol/Lイミダゾール溶出フラクションを回収した。

該フラクションを 50 mmol/L Tris-HCl, pH8.6 / 6mol/L 尿素 / 20 mmol/L ジチオスレイトール / 0.15 mol/L 塩化ナトリウム / 100 mmol/L 塩化カルシウム / 100 $\mu\text{mol/L}$ 塩化亜鉛 / 0.02% アジ化ナトリウムで希釈し (200 倍希釈)、シスタミン (最終濃度 20 mmol/L) を加えた。次いで、50 mmol/L Tris-HCl, pH8.6 / 0.15 mol/L 塩化ナトリウム / 10 mmol/L 塩化カルシウム / 100 $\mu\text{mol/L}$ 塩化亜鉛 / 5 mmol/L β -メルカプトエタノール / 1 mmol/L 2-ヒドロキシエチルジスルフィド / 0.02% アジ化ナトリウムに対して、4°Cで透析した。さらに、10倍量の 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5 / 0.15 mol/L 塩化ナトリウム / 10 mmol/L 塩化カルシウム / 50 $\mu\text{mol/L}$ 塩化亜鉛 / 0.02% アジ化ナトリウムに対して透析した (4 時間×3回)。この溶液を 22,000 xg、4°C、10 分遠心し、沈殿を除いた。

得られた上清をアミコン YM-10 (ミリポア製) で 5 倍濃縮し、粗精製酵素とした。

実施例 8 ヒトMT4-MMP (2) 部分ペプチド (活性ドメイン) の活性測定

a) MT4-MMP (2) 部分ペプチド (プロペプチドドメイン+活性ドメイン) の活性化

MMPはトリプシン処理により活性化されメタロプロテアーゼ活性を示すよう

になることが知られている。MT4-MMP (2)においてもそのような処理により活性化されるか以下の方法で調べた。

200 μ Lの粗精製MT4-MMP (2) 部分ペプチド (プロペプチドドメイン+活性ドメイン) 溶液にトリプシン (和光純薬) を0.1 μ g/mLとなるように添加して、37°C、30分間反応後、トリプシンを不活化するためにセリンプロテアーゼインヒビターのフェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF) を1 mmol/L添加した。

b) アッセイ

活性化酵素10 μ Lに測定用緩衝液または測定用緩衝液で希釈した阻害剤 (TIMP-1またはTIMP-2; 最終濃度1 μ g/mL) を加えて50 μ Lとした。そこに10 μ mol/Lの蛍光基質を50 μ L加え、37°Cで120分間反応させた。それぞれの反応時間が来た時点で酵素活性によって発生する蛍光を測定した。蛍光は励起波長 320nm、蛍光波長 395 nmの条件で測定した。

用いた試薬、基質は以下の通りである。

○蛍光基質: DMSO stock (10 mmol/L); MOCAc-Pro-Leu-Gly-Leu-A₂pr(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ (ペプチド研究所)

○標準蛍光基質DMSO stock (1 mmol/L); MOCAc-Pro-Leu-Gly (ペプチド研究所)

○活性測定用緩衝液; 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5; ナカライトスク), 0.1mol/L NaCl (ナカライトスク), 0.01 mol/L CaCl₂ (和光純薬), 0.05% Briji-35(w/v; 和光純薬)

表2に活性の測定結果を示した。他のMMPs同様、MT4-MMP (2) 部分ペプチド、特にトリプシンによる活性化後のMT4-MMP (2) 部分ペプチドによる強い基質分解活性が認められた。

MT-MMPはメタロプロテアーゼ阻害剤であるTIMP-1によっては阻害されず、TIMP-2によっては阻害されることが報告されている [FEBS Letters, 393, 101

(1996)]。

MT4-MMP (2) もかかる性質を有するかを検討した。

表2に示すように、MT4-MMP (2) の活性は他のMT-MMPと同様にTIMP-1によっては阻害されずTIMP-2によって強く阻害された。

以上のことから、MT4-MMP (2) はMT-MMPの1種であることが示された。

表2 ヒトMT4-MMP (2) 部分ペプチド(活性ドメイン)の活性測定

試料	トリプシン処理	阻害剤	蛍光強度 (平均±SD) (n=3)
プランク			0.000±0.057
ヒトMT4-MMP(2)部分ペプチド	-	なし	1.304±0.056
ヒトMT4-MMP(2)部分ペプチド	+	なし	4.882±0.102
ヒトMT4-MMP(2)部分ペプチド	+	TIMP-1	3.493±0.166
ヒトMT4-MMP(2)部分ペプチド	+	TIMP-2	0.076±0.065

実施例9 マウスMT5-MMP遺伝子のクローニング

マウスMT3-MMP遺伝子を単離するために、マウス17日胚の脳cDNAライブラリーをZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene)を用い、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

ヒトMT3-MMP遺伝子をプローブとして上記cDNAライブラリーのスクリーニングをブラークハイブリダイゼーション法により行った。強いシグナルと弱いシグナルを示すブラークが得られたため、それらのクローンの塩基配列を決定した。

弱いシグナルを示すクローンを解析した結果、その中の一つの2.1kbの配列はヒトならびにラットMT3-MMPと弱い相同性を示すが、他のMMPとも相同性が大幅に異なることから、新規のMMP遺伝子であると考えられた。

続いて、上記ライブラリーからブラークハイブリダイゼーション法により2.1kbの配列とハイブリダイズする3.7kbのcDNAを取得した。2.1kbと3.7kbの配列から、配列番号7に示す4.2kbのcDNA配列が得ら

れた。

配列番号7に示すcDNAには配列番号5で表される618アミノ酸の蛋白質がコードされていた。配列番号5のペプチドはMT-MMPの各ドメインに相当する配列をよく保存された状態で持っていることから、新規のMT-MMP、即ち、マウスMT5-MMPであると結論された(図1)。

実施例10 ヒトMT5-MMP遺伝子のクローニング

マウスMT5-MMPに対応するヒト遺伝子を確認する為に、マウスMT5-MMP遺伝子をプローブとしてヒト腎臓cDNAライブラリー(クロンテック社製)のスクリーニングを上記実施例9と同様の方法でブラークハイブリダイゼーションを行い、マウスMT5-MMPと92%の相同性を有し、既知のMT-MMPとは異なる遺伝子を得た。

解析したヒトMT5-MMPのcDNAクローンは全て、シグナルペプチドをコードするはずの5'領域を欠いていたため、以下に示す5'RACE法によって欠損部分の配列を決定し、ヒトMT5-MMPをコードする全領域を含む遺伝子配列を決定した。

cDNAはsuperscript II(ギブコBRL)を使用して、ヒト脳のpoly(A)+RNA(クロンテック社製)とヒトMT5-MMP選択的なプライマー(配列番号19)を用いて、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

得られたcDNAに単一鎖のオリゴヌクレオチドアダプター(配列番号10)をT4RNAリガーゼでつなぎ、MT5-MMP選択的なプライマー(配列番号19)とアダプター選択的なプライマー(配列番号11)でGC緩衝液とLA Taq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。

PCR後、遺伝子選択的な他のプライマー(配列番号20)とアダプター選択的なプライマー(配列番号13)を用いてPCRを行った。マウス遺伝子をプローブとしてヒト腎臓cDNAライブラリーから得られた配列と5'RACE法によって得られた配列から、配列番号6の645アミノ酸の蛋白質をコードする配列番号8の2.6kbのcDNAが取得できた。

実施例 1 1 MT 5 - MMP の mRNA の臓器での発現

組織におけるMT 5 - MMP 遺伝子発現をノーザン・プロッティングで調べた。即ち、20 μ g の全RNAを1%アガロースゲルで泳動しナイロンメンブレンに転写し、 32 Pで標識したマウスMT 5 - MMP 遺伝子をプローブに用いてノーザンプロッティングを行い、約4 kbのMT 5 - MMP のmRNAの発現パターンを調べた。

2週齢のマウスでは、発現は脳にのみ強いシグナルが観察され、他の臓器の組織では脳に比べて検出限界かそれ以下の低い発現しか認められなかった。

ヒトの組織での発現をヒトMT 5 - MMP 遺伝子をプローブに用いて multiple tissue blot (クロントック社製) を行って調べたところ、脳に高発現であった。 32 Pで標識したMT 5 - MMP 遺伝子をプローブに用いてノーザンプロッティングを行い、ヒト脳でも4.0 kbと4.8 kbのMT 5 - MMP のmRNAの強い発現が認められた。ヒトではそれ以外に腎臓と脾臓で発現が認められた。脳では4.8 kbのmRNAが、腎臓と脾臓では4.0 kbのmRNAが強く発現していた。

MT 5 - MMP 特異的なプライマー (配列番号21および22) を用いた、RT - PCRによる解析では腎臓、脾臓ともに脳と同じサイズのDNA断片が同程度の効率で増幅し、サイズの異なるプロダクトが見られないことから、短い転写産物も完全なコーディング領域を持つと考えられる。

MT 5 - MMP の発現をマウス及びヒトで調べると特徴的な発現が脳に見られた。特にマウスで見る限り、発現は脳に限局しており、他の臓器での発現は非常に低かった。

脳の発現に特徴があることから、脳の組織別プロット (human brain multiple tissue blot : クロントック社製) を用い、部位特異的発現を調べた。

MT 5 - MMP の発現は小脳に高い発現が見られる他、大脳皮質、髓質、後頭部、前頭部、側頭部、被殻での発現が認められたが、脊髄での発現は見られなかった。

この結果は、他のMT - MMP が様々な組織で発現するのとは異なる、MT 5 - MMP 特有の際だった特徴を示している。

ヒトでも、脳の発現は強く、それ以外にも腎臓及び脾臓での発現が見られた。ヒト脳の部位特異的な発現を調べると、小脳での高発現が特徴的であった。小脳での高発現はマウスでも確認された。

この結果は、MT 5-MMPは脳組織の形成と維持、神経回路構築などの過程に伴う細胞周辺の細胞外基質分解を制御している可能性を示している。

実施例 1 2 MT 5-MMP の mRNA の癌細胞での発現

MT 1-MMPは多くの癌組織で、癌細胞自身及び周辺の間質細胞で高頻度に発現しており、ゼラチナーゼAの組織レベルでの活性化因子として働いている。様々な癌細胞株における発現をMT 5-MMP特異的なプライマー（配列番号21および22）を用いて、RT-PCRで調べた。

結果を表3に示した。

表3 MT 5-MMP 転写産物の癌細胞での発現

癌細胞株	MT5-MMP	寄託番号
Jurkat (T cell)	-	ATCC TIB-152
Raji(B cell)	-	ATCC CCL-86
BJAB(B cell)	-	ATCC HB-136
THP-1(monocytic)	-	ATCC TIB-202
K562(monocytic)	-	ATCC CCL-243
U-937(monocytic)	-	ATCC CRL-1593.2
U-251 MG(astrocytoma)	-	発酵研 IF050288
SK-N-SH(neuroblastoma)	+++	ATCC HTB-11
no.10(glioma)	++	発酵研 IF050368
KALS-1(glioma)	+++	発酵研 IF050434
MKN-7(gastric)	+	理化研 RCB0999
MKN-28(gastric)	-	理化研 RCB1000
NUGC-4(gastric)	+	HS財団 JCRB0834
PANC-1(pancreatic)	+	ATCC CRL-1469
MIA PaCa-2(pancreatic)	+	ATCC CRL-1420
SK-HEP-1(hepatoma)	+	ATCC HTB-52
Hep 3B(hepatoma)	+	ATCC HB-8064
ZR-75-1(breast)	?	ATCC CRL-1500
MCF7(adenocarcinoma)	-	ATCC HTB-22
T-24(bladder)	-	ATCC HTB-4
A375(melanoma)	+/-	ATCC CRL-1619
HT-1080(fibrosarcoma)	+/-	ATCC CCL-121

+++ : 非常に強発現、++ : 強発現、+ : 中程度の発現、+/- : 少量発現、- : 発現無し

ATCC : American Type Culture Collection

HS 財団 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

理化研 : 特殊法人理化学研究所

発酵研 : 財団法人発酵研究所

MT 1 - MMP が様々な癌細胞株で発現しているのに対して、MT 5 - MMP の発現細胞は限られていたが、脳での発現に一致して神経系由来の神経芽細胞腫 [SK-N-SH (HTB-11, ATCC)]、未分化型グリオーマ [no. 10 (IF050368, 発酵研究所)]、グリオーマ [KALS-1 (IF050434, 発酵研究所)] で高い発現が見られた。

また、肺臓癌 [PANC-1 (CRL-1469, ATCC) , MIA PaCa-2 (CRL-1420, ATCC)]、肝癌 [SK-HEP-1 (HTB-52, ATCC) , Hep 3B (HB-8064, ATCC)] での発現が特徴的であった。

MT - MMP の細胞表面での異常発現は細胞の浸潤性を亢進させることが考えられる。実際に MT 1 - MMP の過剰発現は癌細胞株の浸潤能を亢進させ、実験的転移を高発させる。ヒト癌組織では癌細胞や周辺の線維芽細胞が MT 1 - MMP を高頻度で発現しており、MT 1 - MMP が発現場所で活性化させるゼラチナーゼ A の存在は癌の浸潤・転移とよく相関する。

未分化型グリオーマ、グリオーマ、肺臓癌、肝がんの細胞株で発現が見られることから、特定のタイプの癌では MT 5 - MMP の過剰発現が癌細胞の悪性性質に関与している可能性が示唆された。

実施例 13 マウスMT5-MMP部分ペプチド（プロペプチドドメイン+活性ドメイン）の大腸菌での発現

配列番号 5 の 40 ~ 300 番目に示されるアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基の付加した配列を有するマウス MT5-MMP 部分ペプチドをコードする cDNA を、マウス MT5-MMP の cDNA を鋳型として用いポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で増幅した。

得られた増幅断片を大腸菌の発現ベクターである pET3a (宝酒造社製) にサブクローニングして、さらに大腸菌株 BL21 (DE3) pLysS (宝酒造社製) に導入した。該大腸菌を 100 μg/mL のアンピシリン存在下、1 L の発現用培地 (トリプトン 12g/L、イーストエクストラクト 24g/L、塩化ナトリウム 10g/L、トリスマベース 250mg/L、

グリセロール4mL/L) でOD₆₀₀が0.5になるまで培養して、0.4 mmol/Lのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) で刺激後さらに3時間培養した。

培養後、常法に基づいて大腸菌内に形成されたマウスMT5-MMP部分ペプチドよりなる顆粒 (inclusion body) を取得し、8 mol/L尿素、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6) および20 mmol/Lジチオスレイトール (DTT) を含む可溶化液に溶解した。該溶解液をQ-アニオニオン交換カラムにアプライし、0.1 M NaCl溶出画分を回収した。

該フラクションを50 mmol/L Tris-HCl (pH8.6)、6mol/L尿素、1 mmol/Lジチオスレイトール、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、100 mmol/L 塩化亜鉛、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液で希釀し、該希釀溶液にシスタミン (最終濃度 20 mmol/L) を加えた。次いで、50 mmol/L Tris-HCl (pH8.6)、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、100 mmol/L 塩化亜鉛、5 mmol/L β メルカプトエタノール、1 mmol/L 2-ヒドロキシエチルジスルフィド、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液 4L に対して、4°Cで一晩透析した。さらに、10 倍量の 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、0.15 mol/L 塩化ナトリウム、5 mmol/L 塩化カルシウム、50 μmol/L 塩化亜鉛、0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液で透析した (4 時間×3 回)。この溶液を 22000 xg、4°C、10 分間遠心分離し、沈殿を除いた。

得られた上清をアミコン YM-10 (ミリポア製) で濃縮し、0.1 μg/mL トリプシンで30分間37°Cで処理した。トリプシンを1 mmol/L DTT で失活させた後、50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、150 mmol/L 塩化ナトリウム、10 mmol/L 塩化カルシウムおよび0.02% アジ化ナトリウムを含む緩衝液で平衡化した S-200 カラムクロマトグラフィーに通塔し、ゲルろ過を行い、マウス MT5-MMP 部分ペプチド (プロペプチドドメイン+活性ドメイン) を取得した。

ヒト MT5-MMP も同様の方法で発現が可能である。

実施例14 マウスMT5-MMP部分ペプチド (活性ドメイン) の活性測定

ProMMP-2 (final 1 μg/mL)、MT-5 MMP 部分ペプチド (プロペプチドドメイン+活性ドメイン) (最終濃度 1 μg/mL) を混和し、37°Cで1時間インキュベートした。

この際に Briji 35 添加 TNC バッファー[50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 0.02% NaN₃, 0.05% Briji 35]を用いた。インキュベーション後、サンプルに SDS/PAGE Loading buffer を等量加えて、定法に従い電気泳動後、クーマーシー染色を行った。ProMMP-2 活性化のポジティブコントロールとして p-aminophenylmercuric acetate(APMA)を用いた。その結果 MMP 濃度依存的に ProMMP-2 の活性化が認められた。図 2 に結果を示す。

産業上の利用可能性

本発明により得られる新規MT 4-MMP (2) ポリペプチドのDNAを用いることにより、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、角膜潰瘍を含む創傷、白血病、癌、白血球の浸潤を伴う炎症等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

また、本発明により得られる新規MT 5-MMP ポリペプチドのDNAを用いることにより、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、角膜潰瘍を含む創傷、白血病、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、癌、白血球の浸潤を伴う炎症等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

請求の範囲

1. 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
2. 請求項1記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
3. 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
4. 請求項3記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
5. 配列番号5記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
6. 請求項5記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
7. 配列番号6記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
8. 請求項7記載のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
9. 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNA。
10. 請求項5から8のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNA。
11. 配列番号3の86～1846番または配列番号4の100～1917番に記載の塩基配列からなるDNAまたは該DNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
12. 配列番号7の75～1928番または配列番号8の1～1935番に記載の塩基配列からなるDNAまたは該DNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
13. 請求項9から12のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで

得られる組換え体DNA。

14. 請求項13記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

15. 形質転換体がEscherichia属に属する微生物である、請求項14記載の形質転換体。

16. Escherichia属に属する微生物がEscherichia coliである、請求項15記載の形質転換体。

17. 請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

18. 請求項9または11のいずれか1項に記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

19. 請求項10または12のいずれか1項に記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるオリゴヌクレオチド。

20. 請求項18または19に記載のオリゴヌクレオチドを用いて請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

21. 請求項18または19に記載のオリゴヌクレオチドを用いて請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

22. 請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現する細胞を用いることを特徴とする、該ポリペプチドの阻害薬または活性化薬のスクリーニング法。

23. 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に

伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

24. 請求項5～8のいずれか1項に記載のポリペプチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

25. 請求項9または11記載のDNAを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

26. 請求項10または12記載のDNAを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

27. 請求項18記載のオリゴヌクレオチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

28. 請求項19記載のオリゴヌクレオチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

29. 請求項9または11のDNA、または請求項18記載のオリゴヌクレオチドをベクターに組み込んで得られる、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の治療のための遺伝子治療用ベクター。

30. 請求項10または12のDNA、または請求項19記載のオリゴヌクレオチドをベクターに組み込んで得られる、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、肺炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍のための遺伝子治療用ベクター。

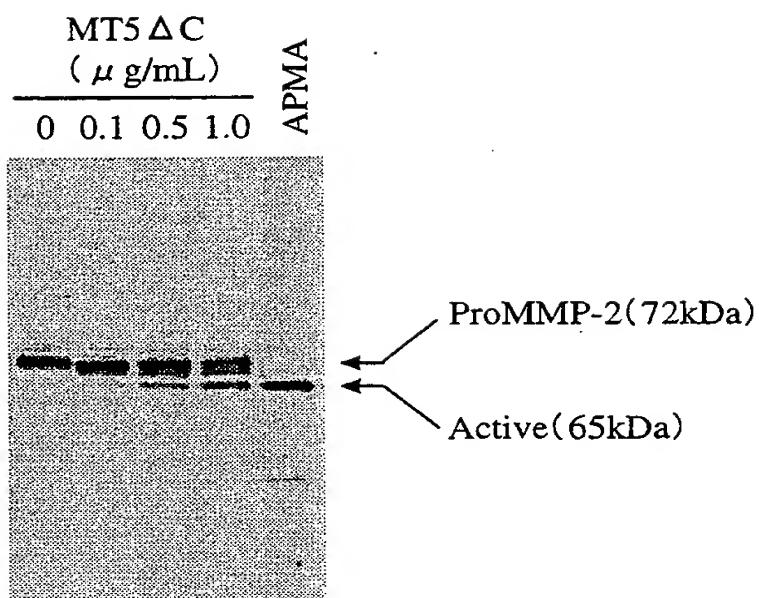
31. 請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング法。

32. 遺伝子の発現を調節する化合物を、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することにより検出することを特徴とする、請求項31記載のスクリーニング法。

1

human MT1-MMP	1	---MSPAP----RP-----SRCLLPL-LTIGTALASLGSQAS-----SSFSPEAWLQQYGYLPPGD	49
human MT2-MMP	1	---MGSDPSAPGRGPWT----GSLLGDREEAARPRLLPL-LVLLGCLGLGVAAED-----AEVHAENWLRLYGYLPQPS	67
human MT3-MMP	1	---MILLTFSTGRRLDFVH----HSGVFFLQT-LLWILCATVCG-----TEQYFNVEVWLQKYGGLPPTD	57
human MT4-MMP(2)	1	---MRRRAARGPGPP-PPGP-----G1SRLPLLPLPLLLLALGTRGGCAAPEPAR-----RAEDLSLGVEWLSRFGYLP PAD	69
human MT5-MMP	1	---MPRSRGGRAAPGPPPPPPPPGQAPRWSRWRVPGRLLLL-LLPALCLCPGAARAAAAAGAGNRAAVAVARADEAEAPFAQGNWLKS VGYLPYD	95
mouse MT5-MMP	1	---MPRSRGGRAAPG-----QASRWSGWRAPGRLLP-LLPALCLCAAAGAGKPG-----ADAPFAQGNWLKS VGYLPYD	68
		* * * * *	* * . ***
human MT1-MMP	50	50 LRTHTQRSPQSLSAIAAMQKFYGLQVTKADADTMKAMRPRCVPDKFGEIAKANVRR--KRYA1QCLKWHQNEITFCI QNYT--PKVGEYATYEAIR	145
human MT2-MMP	68	68 RHMSTMRSQAI LASALAEQMQRFYCIPVTGVLD EETKEWMKPRCVPDQFQGVRVKANLRRRKRYALTRGKWNHHHTFSI QNYT--EKLGYWHSMEAVR	165
human MT3-MMP	58	58 PRMSVLRSAETMQSALAAAMQFYG1NMTGKVRNRTIDWMKKPRCVPDQTRGSSKHFIRR--KRYALTGKWHQKHHTYISIKNVT--PKVGD PETRKAIR	153
human MT4-MMP(2)	70	70 PTTGQLQTQEELSKA1TAMQFQGGEATG1LDEATLALMKTPRCSLPDPVLTQ--ARR--RRQAPAPTKWNKRNLSWRV RVTFRD SPLGHDTV RALMY	164
human MT5-MMP	96	96 SRASALHSAKALQSAVSTMQFYG1PVTGVLDQTTI EWMKKPRCVPDHPHLSR--RRRN--KRYALTGKWHQKHHTYISIHN YT--PKVGE DTRKAIR	189
mouse MT5-MMP	69	69 SRASALHSGKALQSAVSTMQFYG1PVTGVLDQTTI EWMKKPRCVPDHPHLSR--RRRN--KRYALTGKWHQKHHTYISIHN YT--PKVGE DTRKAIR	162
		* * * * *	* * * * *
human MT1-MMP	146	146 KAFRVWESATPLRFREV PYAYIREGHEKQADIMIFFAEGFHGDSTPFDGEGGFLAHAYFPGP--IGGDTHFD SAE PWTVRN EIDLNGNDI FLVAVH E LGA	244
human MT2-MMP	166	166 RAFRVW EATPLV FQEV PYEDIRLRRQK EADIMVLFASGFHG DSSPF DGTG GFLAHAYFPGP--LCGDTHFDADEPWTFSSTD LGGNLFLVAVH E LGA	264
human MT3-MMP	154	154 RAFDVWQNVTPPLT FEEV PYSELENGK-RD VDITI 1FASGFHG DSSPF DGE GGFLAHAYFPGP--IGGDTHFD SDE PWTLGPNHDGNDLFLVAVH E LGA	251
human MT4-MMP(2)	165	165 YALKVWS DIA PLNFHEV----AGS--TAD1Q1DFSKADHNDGYPFDARR-HRAHAFPGH HHTAGYTHFN DDEA WTFRSSDAH GMDL FAVAVHEFGHA	255
human MT5-MMP	190	190 QAFDVWQKVTPPLT FEEV PYHEIKSDR-KEADIMIFFASGFHG DSSPF DGE GGFLAHAYFPGP--IGGDTHFD SDE PWTLGPNHDGNDLFLVAVH E LGA	287
mouse MT5-MMP	163	163 QAFDVWQKVTPPLT FEEV PYHEIKSDR-KEADIMIFFASGFHG DSSPF DGE GGFLAHAYFPGP--IGGDTHFD SDE PWTLGPNHDGNDLFLVAVH E LGA	260
		* * * * *	* * * * *
human MT1-MMP	245	245 LGLEHSSDPSA1MAPFYQWMDTE--NFVLPDDDRG1QQLYCGESG-----FPTKMPQ P-----RTTSRSPVPDKPKNP-----312	
human MT2-MMP	265	265 LGLEHSSNPNA1MAPFYQWKD VD--NFKLPEDDLRG1QQLYCTPDGQPQPTQPLPTVTPR P-----RPDHRPRPPQPPP GKP PERPKGPPVQPR	357
human MT3-MMP	252	252 LGLEHSSNDPTA1MAPFYQYMETD--NFKLPNDDLQG1QK1YGPDK1PPPTRLPTVPHRS1PPADPRKNDR-PKPPRPTG-----331	
human MT4-MMP(2)	256	256 IGLSHVAAAH S1MRPYYQGPVGDPLRYGLPYEDKVRVWQLYGVRESVPTAQ--PEEPLLPE-----PPDNRSASSPRKD-----329	
human MT5-MMP	288	288 LGLEHSSDPSA1MAPFYQYMETD--NFKLPQDDLQG1QK1YGPAAEPLTRPLPTLVRRIHSPSE-RKHERQPRP RPLG-----368	
mouse MT5-MMP	261	261 LGLEHSSNDPSA1MAPFYQYMETD--NFKLPQDDLQG1QK1YGPAAEPLTRPLHTLVRRIHSPSE-RKHERQPRP RPLG-----341	
		* * * * *	* * * * *
human MT1-MMP	313	313 -----TYGP1CDGNFDTVAMLRGEMFVFKRWFWRVRNNQ-VMDGYPMP1GQFWRGLP--ASINTAYER-KDGKFVFFKGDKHWV FDEASLEPGYPK	401
human MT2-MMP	358	358 ATERPDQYGP N1CDGFDTVAMLRGEMFVFKRWFWRVRNNR-VLDNYPMP1GHFWRGLP--GD1SAAYER-QDGRFVFFKGDRYWLFR EANLEPGYPK	452
human MT3-MMP	332	332 -RPSYPGAKPN1CDGNFNTLAI1LRREM FVFKDQFWFWRVRNNR-VMDGYPM1QTYFWRGLP--PS1DAVYEN-SDGNFVFFKGK NYWVF KDTLQGPYH	425
human MT4-MMP(2)	330	330 -----VPHRCSTHF DAVAQ1RGEAFFGKGYFWRLTRDRHLVLSLQPAQHWFWRGLPLHLD SV DAVYERTSDHK1VFRKGDRYWVTFKDNVNEEGYPR	421
human MT5-MMP	369	369 -RPSTPGTKPN1CDGNFNTVALFRGEMFVFKDRWFWRVRNNR-VQEGYPM1QE FWKGLP--ARI DAAYER-ADCRFVFFKGDKYWVFKEVTEPGYPH	462
mouse MT5-MMP	342	342 -RPSTPGAKPN1CDGNFNTVALFRGEMFVFKDRWFWRVRNNR-VQEGYPM1QE FWKGLP--ARI DAAYER-ADCRFVFFKGDKYWVFKEVTEPGYPH	435
		* * * * *	* * * * *
human MT1-MMP	402	402 HIKELGRGLPTDK1DAALFWMPNGKTYFFRGK NYRNEELRAVDSEPKN1KVWE G1PESPRGSFGMSDEVFTFYKGK NYWFKFNNQKLKVEPGYPKSA	501
human MT2-MMP	453	453 PLTSYGLG1PYDR1DTA1WWEPTGHTFFFQEDRYWRFN EETQRGDPGYPK P1SVWQG1PASPKGAFLSNDAAYTYFYGKTYWKF DN ERLRMEPGYPK S1	552
human MT3-MMP	426	426 DLITLGSG1PPHG1DSAI1WEDVGKTYFFKGDRYWRYSEEMKTM DPGYPK P1TVWKG1PESPGQAFVHKG FEN GTFYKGKEYWKFNNQKLKVEPGYPRS1	525
human MT4-MMP(2)	422	422 PVSDFS--LPPG G1DAFSW AHDNRTYFFKDQLYWRYDDHTRHMDPGYP AQSPLW RGV P VSTLDDAMRWS DSG--ASYFFRGQ EY WVF KLDGELEV A PGYPQST	518
human MT5-MMP	463	463 SLGELGSCLPREG1DTALRWE PVGKTYFFKG ERYWRYSEERRATDPGYPK P1TVWKG1PQAPQGAF1SKEGYYTTFYKGDRYWKF DN QKL SVEPGYP RNI	562
mouse MT5-MMP	436	436 SLGELGSCLPREG1DTALRWE PVGKTYFFKG ERYWCYSEERRATDPGYPK P1TVWKG1PQAPQGAF1SKEGYYTTFYKGDRYWKF DN QKL SVEPGYP RNI	535
		* * * * *	* * * * *
human MT1-MMP	502	502 LRDWMGCPSSGRPDE-----GTEEEETEV1I EVDE-----EGGG-----AVSAAVVLPV LLLL LVLAVGLAVFFFRRH	565
human MT2-MMP	553	553 LRDWMG CQE HVEPGP RWP DVAR PFPNPHGGA EPGAD SAEGDVG DGDGF GAGV NKDG SRS VV QMEE VARTV NVV MVLVPL LLL C VLG LTYA L VQMRK	652
human MT3-MMP	526	526 LKDFMGCDG-PTDRVKEGH-----SPPDDV1V1KLDNTAS-----TVKA1A1V1PC1LAC LCLV L VYTVFQF K R K	590
human MT4-MMP(2)	519	519 ARDWLVC GDSQADGSVAAGDAAE--GPRAPPGQHDQSRS E DGY EVC-----SCTGASSPPGAPGPVLAATM LLL P P-----590	
human MT5-MMP	563	563 LRDWMG CQNKEVERRKERR-----LPQDDVD1MV1TINDVPG-----SVNAV VV1PC1L SLC1L VLVY T1FQF K N K	628
mouse MT5-MMP	536	536 LRDWMG CQNKEVERRKERR-----LPQDDVD1MV1TINDVPG-----SVNAV VV VPC1L SLC1L VLVY T1FQF K N K	601
		* . *	* . *
human MT1-MMP	566	566 GTPRRLYL C QRS LLD KV	582
human MT2-MMP	653	653 G A P R V L L Y C Q R S L Q E W V	669
human MT3-MMP	591	591 GTPR H I L Y C Q R S L Q E W V	607
human MT4-MMP(2)	591	591 LSPGALWTAAQALTL--	605
human MT5-MMP	629	629 TGPQPV TYYKRPVQ E W V	645
mouse MT5-MMP	602	602 AGPQPV TYYKRPVQ E W V	618

☒ 2



SEQUENCE LISTING

<110> Seiki Motoji

<120> DNA CODING FOR NOVEL POLYPEPTIDE

<130> PH-668-PCT

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 587

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Gly Arg Arg Pro Arg Gly Pro Gly Ser Pro Arg Gly Pro Gly Pro

1

5

10

15

Pro Arg Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro Leu Leu Leu Val Leu Ala Leu

20

25

30

Ala Ala His Gly Gly Cys Ala Ala Pro Ala Pro Arg Ala Glu Asp Leu

35

40

45

Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala

50 55 60

Asp Pro Ala Ser Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala

65 70 75 80

Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Thr Thr Gly Ile Leu

85 90 95

Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro

100 105 110

Asp Leu Pro Pro Gly Ala Gln Ser Arg Arg Lys Arg Gln Thr Pro Pro

115 120 125

Pro Thr Lys Trp Ser Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe

130 135 140

Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly Arg Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr

145 150 155 160

Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Thr Pro Leu Asn Phe His Glu

165 170 175

Val Ala Gly Asn Ala Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp

180 185 190

His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly Thr Val Ala His

195 200 205

Ala Phe Phe Pro Gly Asp His His Thr Ala Gly Asp Thr His Phe Asp

210 215 220

Asp Asp Glu Pro Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp

225 230 235 240

Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser

245 250 255

His Val Ala Ala Pro Ser Ser Ile Met Gln Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro

260 265 270

Val Gly Asp Pro Val Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Arg Val Arg

275 280 285

Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln

290 295 300

Leu Asp Thr Pro Glu Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro

305 310 315 320

Asn Asn Arg Ser Ser Thr Pro Pro Gln Lys Asp Val Pro His Arg Cys

325 330 335

Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe

340 345 350

Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val

355 360 365

Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu

370 375 380

His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys

385 390 395 400

Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn

405 410 415

Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro

420 425 430

Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr

435 440 445

Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg Arg

450 455 460

Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro

465 470 475 480

Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe

485 490 495

Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Ala

500 505 510

Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly

515 520 525

Glu Pro Leu Ala Asp Ala Glu Asp Val Gly Pro Gly Pro Gln Gly Arg

530 535 540

Ser Gly Ala Gln Asp Gly Leu Ala Val Cys Ser Cys Thr Ser Asp Ala

545 550 555 560

His Arg Leu Ala Leu Pro Ser Leu Leu Leu Leu Thr Pro Leu Leu Trp

565 570 575

Gly Leu Trp Thr Ser Val Ser Ala Lys Ala Ser

580 585

<210> 2

<211> 606

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Arg Arg Ala Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro

1 5 10 15

Gly Leu Ser Arg Leu Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu

20 25 30

Ala Leu Gly Thr Arg Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg

35

40

45

Ala Glu Asp Leu Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr

50

55

60

Leu Pro Pro Ala Asp Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu

65

70

75

80

Leu Ser Lys Ala Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala

85

90

95

Thr Gly Ile Leu Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg

100

105

110

Cys Ser Leu Pro Asp Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg

115

120

125

Gln Ala Pro Ala Pro Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg

130

135

140

Val Arg Thr Phe Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg

145

150

155

160

Ala Leu Met Tyr Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu

165

170

175

Asn Phe His Glu Val Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe

180

185

190

Ser Lys Ala Asp His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly

195 200 205

Thr Val Ala His Ala Phe Phe Pro Gly His His His Thr Ala Gly Asp

210 215 220

Thr His Phe Asp Asp Asp Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala

225 230 235 240

His Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala

245 250 255

Ile Gly Leu Ser His Val Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr

260 265 270

Tyr Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu

275 280 285

Asp Lys Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser

290 295 300

Pro Thr Ala Gln Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp

305 310 315 320

Asn Arg Ser Ser Ala Pro Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser

325 330 335

Thr His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe

340 345 350

Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser

355 360 365

Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His

370 375 380

Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile

385 390 395 400

Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val

405 410 415

Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly

420 425 430

Gly Ile Asp Ala Ala Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe

435 440 445

Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met

450 455 460

Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser

465 470 475 480

Thr Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe

485 490 495

Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala

500

505

510

Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp

515

520

525

Ser Gln Ala Asp Gly Ser Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly

530

535

540

Pro Arg Ala Pro Pro Gly Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly

545

550

555

560

Tyr Glu Val Cys Ser Cys Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala

565

570

575

Pro Gly Pro Leu Val Ala Ala Thr Met Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu

580

585

590

Ser Pro Gly Ala Leu Trp Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu

595

600

605

<210> 3

<211> 3517

<212> D N A

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (86)..(1846)

<400> 3

ggcacgaggg cgcggagccg agcgaggcgcc gagctggct gctggcgggt gcggggaccc 60

tcgccacccg acctgggaga gcggg atg gga cgc cgc ccg gga cct ggg 112
Met Gly Arg Arg Pro Arg Gly Pro Gly

1 5

tcc ccc cgg gga cct ggc cct cca cgc ccc ggg ccg ggg ctg cca cca 160
Ser Pro Arg Gly Pro Gly Pro Pro Arg Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro
10 15 20 25ctg ctg ctt gta ctg gcg ctg gcg gcc cat ggg ggc tgc gca gcg ccc 208
Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala His Gly Gly Cys Ala Ala Pro
30 35 40gcg ccc cgc gcg gag gac ctc agc ctc ggg gtg gag tgg cta agc agg 256
Ala Pro Arg Ala Glu Asp Leu Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg
45 50 55ttt ggc tac ctg ccg cct gca gat ccg gca tca ggg cag cta cag acc 304
Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp Pro Ala Ser Gly Gln Leu Gln Thr
60 65 70cag gag gaa ctg tcc aaa gcg att act gcc atg cag cag ttt ggt ggt 352
Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly
75 80 85ctg gag acc act ggc atc cta gat gag gcc act ctg gcc ctg atg aaa 400
Leu Glu Thr Thr Gly Ile Leu Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys

90

95

100

105

acc cct cga tgc tcc ctt ccg gac ctg ccc cct ggg gcc caa tcg aga 448

Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp Leu Pro Pro Gly Ala Gln Ser Arg

110

115

120

agg aag cgg cag act cca ccc cca acc aaa tgg agc aag agg aac ctt 496

Arg Lys Arg Gln Thr Pro Pro Pro Thr Lys Trp Ser Lys Arg Asn Leu

125

130

135

tct tgg agg gtc cgg aca ttc cca cgg gac tca ccc ctg ggc cgg gat 544

Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly Arg Asp

140

145

150

act gtg cgt gca ctc atg tac tac gcc ctc aaa gtc tgg agt gac atc 592

Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile

155

160

165

aca ccc ttg aac ttc cac gag gta gcg ggc aac gcg gcg gac atc cag 640

Thr Pro Leu Asn Phe His Glu Val Ala Gly Asn Ala Ala Asp Ile Gln

170

175

180

185

atc gac ttc tcc aag gcc gac cac aat gac ggc tac ccc ttc gat ggc 688

Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly

190

195

200

cct ggt ggc acg gtg gcc cac gca ttc ttc cct ggt gac cac cac acg 736

Pro Gly Gly Thr Val Ala His Ala Phe Phe Pro Gly Asp His His Thr

205

210

215

gca ggg gac acc cac ttt gat gac gat gag cca tgg acc ttc cgt tcc 784
Ala Gly Asp Thr His Phe Asp Asp Asp Glu Pro Trp Thr Phe Arg Ser

220 225 230

tca gat gcc cac ggg atg gac ctg ttt gca gtg gcc gtc cat gag ttt 832
Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe
235 240 245

ggt cat gcc att ggt ctg agc cat gtt gcc cca agc tcc atc atg 880
Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His Val Ala Ala Pro Ser Ser Ile Met
250 255 260 265

caa ccg tac tac cag ggc ccc gtg ggt gac ccc gta cgc tat gga ctt 928
Gln Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Val Arg Tyr Gly Leu
270 275 280

ccc tat gag gac agg gtg cgt gtc tgg cag ttg tac ggt gtg cgg gaa 976
Pro Tyr Glu Asp Arg Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu
285 290 295

tcc gtg tcc cct act gcc cag ctg gat acc cca gag ccc gag gag cca 1024
Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Leu Asp Thr Pro Glu Pro Glu Pro
300 305 310

ccc ctc ctg cca gag ccc ccc aac aat cgg tct agc act ccg ccc cag 1072
Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asn Asn Arg Ser Ser Thr Pro Pro Gln
315 320 325

aag gac gtg cct cac agg tgc act gcc cac ttt gat gct gtg gcc cag 1120
Lys Asp Val Pro His Arg Cys Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln
330 335 340 345

att cga ggc gaa gca ttc ttt ttc aaa ggc aag tat ttc tgg agg ctg 1168
Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu
350 355 360

acc cgg gac cga cac ttg gtg tcg ctg cag ccg gct caa atg cat cgc 1216
Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg
365 370 375

ttc tgg cgg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agt gtg gac gcc gtg tat 1264
Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr
380 385 390

gag cgt acc agt gac cac aag att gtc ttc ttc aaa gga gac aga tac 1312
Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr
395 400 405

tgg gtg ttt aag gac aac aac gta gag gaa ggg tac ccg cga cct gtc 1360
Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val
410 415 420 425

tcc gac ttc agc ctc ccg cca ggt ggc atc gat gct gtc ttc tcc tgg 1408
Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp
430 435 440

gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg tac tgg cgc 1456

Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg

445

450

455

tat gat gac cac aca cgg cgc atg gac cct ggc tac cct gcc cag gga 1504

Tyr Asp Asp His Thr Arg Arg Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly

460

465

470

ccc ctg tgg aga ggt gtc ccc agc atg ttg gat gat gcc atg cgc tgg 1552

Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp

475

480

485

tct gat ggt gca tcc tat ttc ttc cga ggc cag gag tac tgg aaa gtg 1600

Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val

490

495

500

505

ctg gat ggc gag ctg gaa gca gcc ccc ggg tac cca cag tct aca gcc 1648

Leu Asp Gly Glu Leu Glu Ala Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala

510

515

520

cgc gac tgg ctg gta tgc ggt gag ccg ctg gcg gat gct gag gat gta 1696

Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Glu Pro Leu Ala Asp Ala Glu Asp Val

525

530

535

ggg cct gga ccc cag ggc cgc agt ggg gcc caa gat ggt ctg gca gta 1744

Gly Pro Gly Pro Gln Gly Arg Ser Gly Ala Gln Asp Gly Leu Ala Val

540

545

550

tgt tcc tgc act tca gac gca cac agg ttg gca ctg cca tct ctg ctg 1792

Cys Ser Cys Thr Ser Asp Ala His Arg Leu Ala Leu Pro Ser Leu Leu

555

560

565

ctt ctg act cca ctg ctg tgg ggc ctg tgg acc tca gtc tct gcc aag 1840

Leu Leu Thr Pro Leu Leu Trp Gly Leu Trp Thr Ser Val Ser Ala Lys

570

575

580

585

gca tcc tgagggcagt gctagccttg cgatcaagg agccagggga gcagggacac 1896

Ala Ser

actggccagt actcagcagg acttgtgctc caagcttccg gtccctcgct ctttccttcc 1956

ttccttcctt gaacccaggg gtgctgtgcc atctgctgga gtggcttcca gctgggacag 2016

gacgtcccac caagggcatc catgcacacc ttgcctacct ggagcagcca taggcagctc 2076

cccttccttc ctctgcacat cacgctgctt cggtgcacct tgccggctg cccaagccca 2136

gctgtcacaa ccccaggatg cttgtctgc acctgagcgg ctctgatggc atctgcacgt 2196

gggctgtatga gggcaaaca ggggttcctc gtggtatccg tagggccac catgcctgtt 2256

tcacaagtaa gagagtttatgat gccccgatgg gggAACAGGG tggagaaag gcacctaccc 2316

agaagtctga tccactgccc ttgcagcag ccagcgccgt atctgctgg atagggacc 2376

agtacacactc aggatctgcc cacagattcc cagatgtgg caagggcct tgctccaact 2436

accaggagca cagccaccctc tccccgtcct agataggtta gcatggagg ctgtgtcctg 2496

ttatccctt ctctttggcc aggagagcat tgggtctc cctcgggtgc tgttgatggg 2556

ggtggggggc gcccatacgat atatttcttc atctgtcagt acccatttgct tcagcaagat 2616

gccccatata gttctggcc tgagaccctg cagcttggac tcacagctgt cccctcccc 2676

gctgcagaag ggcttctaacc acctggaata aaggtggcg ttcagtttag ggaaggagga 2736

tggttggggg agcccagggt gatagcaagg gggagctgca gggataagtgc tcagggcct 2796

cggggagtca tgacaatgtt accgcctaacc ttggagatgt aggagctgtg cacggattgc 2856

ttctctgggt gacaaacctc catggtccag aaaggggctg aggttgaacc caagatgggt 2916

taatgagctc cagaaaggaa cagccaaaggtt caaaggttct gggacaagac gggcctgagg 2976

aacagggcca cccaggtagg cgtggctgta gggtaagcag tttctgtcat tggcacgag 3036

atgaaaatta gtgatcacac gcacataccccc ccctccccaa ctggcccggt cccatctcag 3096

gtaagaaagg cttctgtcta ccccaggcca gtttgagtg ttgtcaggat gagtgagcag 3156

ctagcggggc ctaagttct accctccatt tcccaagcct ggcacaccc tagaccctg 3216

tcaagactagg caggacagag tcagggtag gggcatctga gtttccctg tcttgaagc 3276

caccctactc tgccctata tcaaagcagc ctcctatgtat gtcccatgtt gtccaccagc 3336

ctgcaggaca cagatgtcct atacagcaac agggaaagtc caaaaatctt tgtcacatag 3396

cactgaaaac cagacccgca ggctggagct gtctagatgc tgggtcaca ctcatttaa 3456

aacccaaact cttaataaaa attttgtaca ctggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3516

a 3517

<210> 4

<211> 2423 (2438 ではないか?)

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (100)..(1917)

<400> 4

ccggcggggg cgcgcggag agcggagggc gccggctgc ggaacgcgaa gcggagggcg 60

cgggaccctg cacgccgccc gcgggccccat gtgagcgcc atg cgg cgc cgc gca 114

Met Arg Arg Arg Ala

1

5

gcc cgg gga ccc ggc ccg ccg ccc cca ggg ccc gga ctc tcg cgg ctg 162

Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Pro Gly Leu Ser Arg Leu

10

15

20

ccg ctg ctg ccg ctg ccg ctg ctg ctg ctg ctg gcg ctg ggg acc cgc 210

Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Thr Arg

25

30

35

ggg ggc tgc gcc gcg ccg gaa ccc gcg cgg cgc gcc gag gac ctc agc 258

Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Asp Leu Ser

40

45

50

ctg gga gtg gag tgg cta agc agg ttc ggt tac ctg ccc ccg gct gac 306

Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp

55

60

65

ccc aca aca ggg cag ctg cag acg caa gag gag ctg tct aag gcc atc 354

Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile

70

75

80

85

aca gcc atg cag cag ttt ggt ggc ctg gag gcc acc ggc atc ctg gac 402

Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala Thr Gly Ile Leu Asp

90

95

100

gag gcc acc ctg gcc ctg atg aaa acc cca cgc tgc tcc ctg cca gac 450

Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp

105

110

115

ctc cct gtc ctg acc cag gct cgc agg aga cgc cag gct cca gcc ccc 498

Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg Gln Ala Pro Ala Pro

120

125

130

acc aag tgg aac aag agg aac ctg tcg tgg agg gtc cgg acg ttc cca 546

Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro

135	140	145	
cgg gac tca cca ctg ggg cac gac acg gtg cgt gca ctc atg tac tac 594			
Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr			
150	155	160	165
gcc ctc aag gtc tgg agc gac att gcg ccc ctg aac ttc cac gag gtg 642			
Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu Asn Phe His Glu Val			
170	175	180	
gcg ggc agc acc gcc gac atc cag atc gac ttc tcc aag gcc gac cat 690			
Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His			
185	190	195	
aac gac ggc tac ccc ttc gac ggc ccc ggc acc gtg gcc cac gcc 738			
Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly Thr Val Ala His Ala			
200	205	210	
ttc ttc ccc ggc cac cac acc gcc ggg gac acc cac ttt gac gat 786			
Phe Phe Pro Gly His His Thr Ala Gly Asp Thr His Phe Asp Asp			
215	220	225	
gac gag gcc tgg acc ttc cgc tcc tcg gat gcc cac ggg atg gac ctg 834			
Asp Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu			
230	235	240	245
ttt gca gtg gct gtc cac gag ttt ggc cac gcc att ggg tta agc cat 882			
Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His			
250	255	260	

gtg gcc gct gca cac tcc atc atg cgg ccg tac tac cag ggc ccg gtg 930
Val Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro Val

265 270 275

ggt gac ccg ctg cgc tac ggg ctc ccc tac gag gac aag gtg cgc gtc 978
Gly Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Lys Val Arg Val

280 285 290

tgg cag ctg tac ggt gtg cgg gag tct gtg tct ccc acg gcg cag ccc 1026
Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Pro
295 300 305

gag gag cct ccc ctg ctg ccg gag ccc cca gac aac cgg tcc agc gcc 1074
Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp Asn Arg Ser Ser Ala
310 315 320 325

ccg ccc agg aag gac gtg ccc cac aga tgc agc act cac ttt gac gcg 1122
Pro Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser Thr His Phe Asp Ala
330 335 340

gtg gcc cag atc cgg ggt gaa gct ttc ttc ttc aaa ggc aag tac ttc 1170
Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe
345 350 355

tgg cgg ctg acg cgg gac cgg cac ctg gtg tcc ctg cag ccg gca cag 1218
Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln
360 365 370

atg cac cgc ttc tgg cgg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agc gtg gac 1266

Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp

375 380 385

gcc gtg tac gag cgc acc agc gac cac aag atc gtc ttc ttt aaa gga 1314

Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly

390 395 400 405

gac agg tac tgg gtg ttc aag gac aat aac gta gag gaa gga tac ccg 1362

Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro

410 415 420

cgc ccc gtc tcc gac ttc agc ctc ccg cct ggc ggc atc gac gct gcc 1410

Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Ala

425 430 435

ttc tcc tgg gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg 1458

Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu

440 445 450

tac tgg cgc tac gat gac cac acg agg cac atg gac ccc ggc tac ccc 1506

Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met Asp Pro Gly Tyr Pro

455 460 465

gcc cag agc ccc ctg tgg agg ggt gtc ccc agc acg ctg gac gac gcc 1554

Ala Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Thr Leu Asp Asp Ala

470 475 480 485

atg cgc tgg tcc gac ggt gcc tcc tac ttc ttc cgt ggc cag gag tac 1602

Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr

490

495

500

tgg aaa gtg ctg gat ggc gag ctg gag gtg gca ccc ggg tac cca cag 1650

Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro Gly Tyr Pro Gln

505

510

515

tcc acg gcc cgg gac tgg ctg gtg tgt gga gac tca cag gcc gat gga 1698

Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp Ser Gln Ala Asp Gly

520

525

530

tct gtg gct gcg ggc gtg gac gcg gca gag ggg ccc cgc gcc cct cca 1746

Ser Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly Pro Arg Ala Pro Pro

535

540

545

gga caa cat gac cag agc cgc tcg gag gac ggt tac gag gtc tgc tca 1794

Gly Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly Tyr Glu Val Cys Ser

550

555

560

565

tgc acc tct ggg gca tcc tct ccc ccg ggg gcc cca ggc cca ctg gtg 1842

Cys Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Val

570

575

580

gct gcc acc atg ctg ctg ctg ccg cca ctg tca cca ggc gcc ctg 1890

Ala Ala Thr Met Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu

585

590

595

tgg aca gcg gcc cag gcc ctg acg cta tgacacacag cgcgagccca 1937

Trp Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu

600

605

tgagaggaca gaggcgggtgg gacagcctgg ccacagaggg caaggactgt gccggagtcc 1997

ctgggggagg tgctggcgcg ggatgaggac gggccaccct ggccacggaa ggccagcaga 2057

gggcacggcc cgccaggcgt gggcaggctc aggtggcaag gacggagctg tcccctagtg 2117

agggactgtg ttgactgacg agccgagggg tggccgctcc agaagggtgc ccagtcaggc 2177

cgcaccgccc ccagcctcct ccggccctgg agggagcata tcgggctggg ggcccacccc 2237

tctctgtgcc ggcccacca accccaccca cactgctgcc tggtgctccc gccggccac 2297

agggcctccg tccccaggtc cccagtgggg cagccctccc cacagacgag ccccccacat 2357

ggtgccgcgg cacgtccccc ctgtgacgacg ttccagacca acatgacctc tccctgcttt 2417

gtaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa a

2438

<210> 5

<211> 618

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 5

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Gin Ala Ser Arg

1

5

10

15

Trp Ser Gly Trp Arg Ala Pro Gly Arg Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala

20

25

30

Leu Cys Cys Leu Ala Ala Ala Gly Ala Gly Lys Pro Ala Gly Ala

35

40

45

Asp Ala Pro Phe Ala Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu

50

55

60

Leu Pro Tyr Glu Ser Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Gly Lys Ala Leu

65

70

75

80

Gln Ser Ala Val Ser Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr

85

90

95

Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys

100

105

110

Gly Val Pro Asp His Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg

115

120

125

Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser

130

135

140

Ile His Asn Tyr Thr Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala

145

150

155

160

Ile Arg Gln Ala Phe Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe

165

170

175

Glu Glu Val Pro Tyr His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp

180

185

190

Ile Met Ile Phe Phe Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe

195

200

205

Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly

210

215

220

Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly

225

230

235

240

Asn Ala Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu

245

250

255

Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Asn Asp Pro Ser Ala Ile

260

265

270

Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro

275

280

285

Gln Asp Asp Leu Gln Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu

290

295

300

Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu His Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile

305

310

315

320

His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg His Pro Arg Pro Pro Arg

325

330

335

Pro Pro Leu Gly Asp Arg Pro Ser Thr Pro Gly Ala Lys Pro Asn Ile

340

345

350

Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe

355

360

365

Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln

370

375

380

Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala

385

390

395

400

Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe

405

410

415

Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly

420

425

430

Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly

435

440

445

Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe

450

455

460

Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp

465

470

475

480

Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala

485 490 495

Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Phe Tyr

500 505 510

Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu

515 520 525

Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Lys Gln

530 535 540

Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val

545 550 555 560

Asp Ile Met Val Thr Ile Asp Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val

565 570 575

Ala Val Val Val Pro Cys Thr Leu Ser Leu Cys Leu Leu Val Leu Leu

580 585 590

Tyr Thr Ile Phe Gln Phe Lys Asn Lys Ala Gly Pro Gln Pro Val Thr

595 600 605

Tyr Tyr Lys Arg Pro Val Gln Glu Trp Val

610 615

<210> 6

<211> 645

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Pro Pro Pro

1

5

10

15

Pro Pro Pro Pro Gly Gln Ala Pro Arg Trp Ser Arg Trp Arg Val Pro

20

25

30

Gly Arg Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Pro Gly

35

40

45

Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asn Arg Ala Ala

50

55

60

Val Ala Val Ala Val Ala Arg Ala Asp Glu Ala Glu Ala Pro Phe Ala

65

70

75

80

Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Asp Ser

85

90

95

Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Ala Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser

100

105

110

Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln

115

120

125

Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His

130 135 140

Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly

145 150 155 160

Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr

165 170 175

Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe

180 185 190

Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr

195 200 205

His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe

210 215 220

Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly

225 230 235 240

Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr

245 250 255

His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp

260 265 270

Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu

275 280 285

Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr

290 295 300

Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln

305 310 315 320

Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr

325 330 335

Arg Pro Leu Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu

340 345 350

Arg Lys His Glu Arg Gln Pro Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp

355 360 365

Arg Pro Ser Thr Pro Gly Thr Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe

370 375 380

Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg

385 390 395 400

Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met

405 410 415

Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala

420 425 430

Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr

435

440

445

Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu

450

455

460

Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu

465

470

475

480

Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr

485

490

495

Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys

500

505

510

Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe

515

520

525

Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr

530

535

540

Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg

545

550

555

560

Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg

565

570

575

Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr

580

585

590

Ile Asn Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val Ala Val Val Ile Pro
595 600 605

Cys Ile Leu Ser Leu Cys Ile Leu Val Leu Val Tyr Thr Ile Phe Gln
610 615 620

Phe Lys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro
625 630 635 640

Val Gln Glu Trp Val
645

<210> 7

<211> 4263

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (75)..(1928)

<400> 7

gcgggaggac ccggccggag ccgcccgcgc cgccgcccgc atcgcagccg ggccggccggg 60

ccccccgcgc cggg atg ccg agg agc cgg ggc ggc cgc gct gcg ccg ggc 110
Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly

1 5 10

cag gcc tcg cgc tgg agc ggc tgg cgg gcc ccg ggg cgg ctg ctg ccg 158

Gln Ala Ser Arg Trp Ser Gly Trp Arg Ala Pro Gly Arg Leu Leu Pro

15 20 25

ctg ctg ccc gcg ctc tgc tgc ctc gcg gcg gcg ggg ggg gcc ggg aag 206

Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Lys

30 35 40

ccg gcc ggg gcg gac gcg ccc ttc gct ggg cag aac tgg tta aaa tca 254

Pro Ala Gly Ala Asp Ala Pro Phe Ala Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser

45 50 55 60

tat ggc tat ctg ctt ccc tat gag tcg cgg gca tct gcg ttg cat tct 302

Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Glu Ser Arg Ala Ser Ala Leu His Ser

65 70 75

ggg aag gcc ttg cag tcc gcg gtc tcc act atg cag cag ttt tac ggg 350

Gly Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly

80 85 90

atc cca gtc acc ggt gtg ttg gat cag aca aca atc gag tgg atg aag 398

Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys

95 100 105

aaa cct cga tgt ggc gtc cct gat cat ccc cac ttg agc agg agg agg 446

Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His Pro His Leu Ser Arg Arg Arg

110 115 120

aga aat aag cga tat gcc cta act gga cag aag tgg agg cag aaa cac 494

Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Arg Gln Lys His

125	130	135	140	
				542
Ille	Thr	Tyr	Ser	Ile His Asn Tyr Thr Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp
145		150		155
				590
aca	cgg	aag	gct	att cgt cag gct ttc gat gtg tgg cag aag gtg act
Thr	Arg	Lys	Ala	Ile Arg Gln Ala Phe Asp Val Trp Gln Lys Val Thr
160		165		170
				638
cca	ctg	acc	ttt	gaa gag gtg cca tac cat gag atc aaa agt gac cgg
Pro	Leu	Thr	Phe	Glu Val Pro Tyr His Glu Ile Lys Ser Asp Arg
175		180		185
				686
aag	gag	gca	gac	atc atg atc ttc ttt gct tct ggt ttc cat ggt gac
Lys	Glu	Ala	Asp	Ile Met Ile Phe Phe Ala Ser Gly Phe His Gly Asp
190		195		200
				734
agc	tcc	cca	ttt	gat ggg gaa ggg gga ttc cta gcc cat gcc tac ttt
Ser	Ser	Pro	Phe	Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe
205		210		215
				220
				782
cct	ggc	cca	ggg	atc gga gga gac act cac ttt gat tca gat gaa ccc
Pro	Gly	Pro	Gly	Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp Glu Pro
225		230		235
				830
tgg	acg	cta	gga	aat gcc aac cat gat ggc aat gac ctc ttc ctg gtg
Trp	Thr	Leu	Gly	Asn Ala Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val
240		245		250

gcc gtg cat gaa ctg ggc cat gca ctg ggc ttg gag cac tct aat gac 878
Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Asn Asp

255 260 265

ccc agt gct atc atg gct ccc ttc tac caa tac atg gag aca cac aac 926
Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Thr His Asn
270 275 280

ttc aag cta ccg cag gac gat ctc cag ggc atc cag aag att tac gga 974
Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly
285 290 295 300

ccc cca gct gag cct ctg gag ccc aca agg ccc ctc cat aca ctc ccg 1022
Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu His Thr Leu Pro
305 310 315

gtc cgc agg atc cac tcg ccg tct gag agg aag cac gag cgg cac cca 1070
Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg His Pro
320 325 330

agg ccc cca cgg ccg ccc ctt ggg gac ccg cca tcc act cca ggt gcc 1118
Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp Arg Pro Ser Thr Pro Gly Ala
335 340 345

aaa ccc aac atc tgc gat ggc aac ttc aac aca gtg gcc ctc ttc cga 1166
Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg
350 355 360

ggg gag atg ttt gtg ttc aag gat cgc tgg ttc tgg cgc ctg cgc aat 1214
Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn
365 370 375 380

aac cgg gtg cag gaa ggc tac ccc atg cag atc gaa cag ttc tgg aag 1262
Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys
385 390 395

ggc ctg ccc gcc cgc ata gac gca gcc tat gaa aga gct gac ggg aga 1310
Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg
400 405 410

ttc gtc ttc ttc aaa gga gac aag tac tgg gtt ttc aaa gaa gtg acg 1358
Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr
415 420 425

gtg gaa cct ggg tac ccc cac agc ttg ggg gag ctg gga agc tgc ctg 1406
Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu
430 435 440

ccc cgt gaa gga att gac aca gct ctg cgc tgg gaa cct gtg ggc aaa 1454
Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys
445 450 455 460

acc tac ttc ttc aaa ggc gaa cgg tac tgg cgc tac agc gag gag cgg 1502
Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg
465 470 475

cga gcc aca gac cct ggc tac ccc aag ccc atc acc gtg tgg aag ggc 1550

Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly
480 485 490

atc ccg cag gct ccg caa ggg gcc ttc atc agc aag gaa gga tat tac 1598
Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr
495 500 505

acc tac ttc tac aaa ggc cgg gac tac tgg aag ttt gac aac cag aaa 1646
Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys
510 515 520

ctg agc gtg gag cca ggc tac cca cgc aac atc ctg cgt gac tgg atg 1694
Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met
525 530 535 540

ggc tgc aag cag aag gag gta gag cgg cgt aag gag cgg agg ctg ccc 1742
Gly Cys Lys Gln Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro
545 550 555

cag gat gat gtg gac atc atg gtg acc atc gat gac gtg cca ggc tct 1790
Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr Ile Asp Asp Val Pro Gly Ser
560 565 570

gtg aac gct gtg gct gtg gtt gtc ccc tgc aca ctg tcc ctc tgc ctc 1838
Val Asn Ala Val Ala Val Val Val Pro Cys Thr Leu Ser Leu Cys Leu
575 580 585

ctg gtg ctg ctc tac act atc ttc caa ttc aag aac aag gcg ggt cct 1886
Leu Val Leu Leu Tyr Thr Ile Phe Gln Phe Lys Asn Lys Ala Gly Pro

590

595

600

cag ccc gtc acc tac tat aag cgg ccg gtc cag gag tgg gta 1928

Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro Val Gln Glu Trp Val

605

610

615

tgagcagccc agagccctct ctgtctaccc ggtctggcca gccaggccct tcctcaccag 1988

ggctgaggg gcagctctag ccactgccc ctggggccag cagggctaag gcagggttcg 2048

tgttagctg aagtgggtgg tgcaactggc taggctgagt gcggggctgg gagtgatggt 2108

ggctatgccc aggttggta gctggcaccc agctgccagc cttctgtcct gggcagacct 2168

ctctctactc aaggaaatag gccaggccct gtcaggagtc aaggatggtg ccaggaggtg 2228

cccctgaggt cattgcatcc tgtggtgtct gcaagatacc acagctccag tcctggctgg 2288

gaccctagccc tctgaggcaa gccagcacta gctctcaccc cacccaaaga tgccaccaat 2348

cccagtcccc tctgccaaca cctgctggtc agatgtcccc tcatccctac cctactatcc 2408

tccaaggctg cagtccccct gatgccaaca gagtgggcaa aagcctgggt ttcccctgct 2468

agcccataga gagattcctc aggaaacctg ttccaccgt caggtctcct ctgagactca 2528

gaacttaggg tcacatgctg caggcaaggc tgtggccagc tggatctcac aaggacccag 2588

ctgtcatgtc gtgaatattt aaatgtcctg tcactactgt ttaaagtccc atttgcaaa 2648

ggctacttga ggcttaggt cagctagagg tgactgtctt ggtgatgagg ccagtatggt 2708

ggcccttccc cgggcactaa ggaccacggt gctgcaaagg ccactcgggc atcctgatac 2768

tagcgggcat cctgttcagg aggctcaaca gctacaggag ctgaccctgg ttctggggc 2828

ggatgcaagt ttgtgaccat tctctactcc ccctcattaa tgggtcccc tgccctgctc 2888

cagcctgtcc tctgtggcct gggggctcgg cctgactaca ggtaaagcag agaggattct 2948

agagccaccc ttgtcatctt ctcagagtaa gggaccaggg cagcctttta agttctccat 3008

ctacatcccc agtgaccctg aggcaactca gctccagcct ggagtccgtt tttgtgctcc 3068

tatcttgacc ctggcagccc aggtctctgg gtccatctc ctgcactgct ctttagaaaa 3128

gggtcctctt cccagctggt agcagccccaa ggctttgggg tttcccccaa ctccctaacc 3188

caaactacct ttttgttggt tgtttaacc tgaggccctt cttcacatct gacagttcct 3248

aagtcttgggt ttggcttgct caaaaaccac tgggtgcaag tgtcactcac tggctctctg 3308

ccaaacccaa cgggtggtacg aggccggccat caaggtgcta gtgggtcaca gataccaact 3368

ctgacaccttg agcctgcatg ggcttggccc ctgcccgttg gtctctcgcc ctgttagcaca 3428

gacagagact ctcgatgccc tgggagttgt tgagtaaaat ctctgtccc agaagcacct 3488

atgtgggtcc actgtgtccc atctcaccat tgtgttcttg ctcatttgg ccaagggcag 3548

gctccctggg gcaggcgggg aacaactgca gagatttagt gattcatagg tttgtacagc 3608

gttttatact ttgcaaagca ctttatttgc tcacagctgt ccactcacat gaaactccctg 3668

taggctctga gagaggctga gggtagcact catcttaccc tcagaatgaag cacaaggagg 3728

tcttatttac tgccctgcc atccaggtgg ccctggctgg gtctgtgtc cccatcagtg 3788

ggcccttcca gggtccaaga aaactgtctc ttctagtcct ctccctctggg cctccctccc 3848

ccagtcccct ggtccctctc ctcaggttgg tgctcaacttc ttgaaagctc taggccccgc 3908

aggctccctg ttggctcctg gcattccaag gccagttgcg aaagagcagg ggtatggaggc 3968

aggcagccca ggctgcagat gtgagggaca cagggccggg cccagagagg gctcagccta 4028

gaggcttcca atcttggatt cttctgcctg cggtcatctg tttgtccatc agcccaggtc 4088

agagcagtca gaggggcaaa gtactggagc ccccagagct cagcttcccc tcggcctggg 4148

tgacatcaca gcatctcagt gtcggtcaca ttttaaactg atcagccctt gtacaatgtt 4208

ttttaaatca tttctaaata aaacagaaat acagtgttaa aaaaaaaaaa aaaaa 4263

<210> 8

<211> 2620

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1935)

<400> 8

atg ccg agg agc cgg ggc cgc gcc gcg ccg ggg ccg ccg ccg ccg 48
Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Pro Pro Pro
1 5 10 15

ccg ccg ccg ccg ggc cag gcc ccg cgc tgg agc cgc tgg cgg gtc cct 96
Pro Pro Pro Pro Gly Gln Ala Pro Arg Trp Ser Arg Trp Arg Val Pro
20 25 30

ggg cgg ctg ctg ctg ctg ctg ccc gcg ctc tgc tgc ctc ccg ggc 144
Gly Arg Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Pro Gly
35 40 45

gcc gcg cgg gcg gcg gcg gcg ggg gca ggg aac cgg gca gcg 192
Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asn Arg Ala Ala
50 55 60

gtg gcg gtg gcg gtg gcg cgg gcg gac gag gcg gag gcg ccc ttc gcc 240
Val Ala Val Ala Val Ala Arg Ala Asp Glu Ala Glu Ala Pro Phe Ala
65 70 75 80

ggg cag aac tgg tta aag tcc tat ggc tat ctg ctt ccc tat gac tca 288
Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Asp Ser

85	90	95	
cgg gca tct gcg ctg cac tca gcg aag gcc ttg cag tcg gca gtc tcc 336			
Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Ala Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser			
100	105	110	
act atg cag cag ttt tac ggg atc ccg gtc acc ggt gtg ttg gat cag 384			
Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln			
115	120	125	
aca acg atc gag tgg atg aag aaa ccc cga tgt ggt gtc cct gat cac 432			
Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His			
130	135	140	
ccc cac tta agc cgt agg cgg aga aac aag cgc tat gcc ctg act gga 480			
Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly			
145	150	155	160
cag aag tgg agg caa aaa cac atc acc tac agc att cac aac tat acc 528			
Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr			
165	170	175	
cca aaa gtg ggt gag cta gac acg cgg aaa gct att cgc cag gct ttc 576			
Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe			
180	185	190	
gat gtg tgg cag aag gtg acc cca ctg acc ttt gaa gag gtg cca tac 624			
Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr			
195	200	205	

cat gag atc aaa agt gac cgg aag gag gca gac atc atg atc ttt ttt 672

His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe

210

215

220

gct tct ggt ttc cat ggc gac agc tcc cca ttt gat gga gaa ggg gga 720

Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly

225

230

235

240

ttc ctg gcc cat gcc tac ttc cct ggc cca ggg att gga gga gac acc 768

Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr

245

250

255

cac ttt gac tcc gat gag cca tgg acg cta gga aac gcc aac cat gac 816

His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp

260

265

270

ggg aac gac ctc ttc ctg gtg gct gtg cat gag ctg ggc cac gcg ctg 864

Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu

275

280

285

gga ctg gag cac tcc agc gac ccc agc gcc atc atg gcg ccc ttc tac 912

Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr

290

295

300

cag tac atg gag acg cac aac ttc aag ctg ccc cag gac gat ctc cag 960

Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln

305

310

315

320

ggc atc cag aag atc tat gga ccc cca gcc gag cct ctg gag ccc aca 1008
Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr
325 330 335

agg cca ctc cct aca ctc ccc gtc cgc agg atc cac tca cca tcg gag 1056
Arg Pro Leu Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu
340 345 350

agg aaa cac gag cgc cag ccc agg ccc cct cgg ccg ccc ctc ggg gac 1104
Arg Lys His Glu Arg Gln Pro Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp
355 360 365

cgg cca tcc aca cca ggc acc aaa ccc aac atc tgt gac ggc aac ttc 1152
Arg Pro Ser Thr Pro Gly Thr Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe
370 375 380

aac aca gtg gcc ctc ttc cgg ggc gag atg ttt gtc ttt aag gat cgc 1200
Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg
385 390 395 400

tgg ttc tgg cgt ctg cgc aat aac cga gtg cag gag ggc tac ccc atg 1248
Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met
405 410 415

cag atc gag cag ttc tgg aag ggc ctg cct gcc cgc atc gac gca gcc 1296
Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala
420 425 430

tat gaa agg gcc gat ggg aga ttt gtc ttc ttc aaa ggt gac aag tat 1344

Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr

435

440

445

tgg gtg ttt aag gag gtg acg gtg gag cct ggg tac ccc cac agc ctg 1392

Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu

450

455

460

ggg gag ctg ggc agc tgt ttg ccc cgt gaa ggc att gac aca gct ctg 1440

Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu

465

470

475

480

cgc tgg gaa cct gtg ggc aag acc tac ttt ttc aaa ggc gag cgg tac 1488

Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr

485

490

495

tgg cgc tac agc gag gag cgg cgg gcc acg gac cct ggc tac cct aag 1536

Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys

500

505

510

ccc atc acc gtg tgg aag ggc atc cca cag gct ccc caa gga gcc ttc 1584

Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe

515

520

525

atc agc aag gaa gga tat tac acc tat ttc tac aag ggc cgg gac tac 1632

Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr

530

535

540

tgg aag ttt gac aac cag aaa ctg agc gtg gag cca ggc tac ccg cgc 1680

Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg

545	550	555	560	
aac atc ctg cgt gac tgg atg ggc tgc aac cag aag gag gtg gag cgg				1728
Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg				
565	570	575		
cg ^g aag gag cg ^g cg ^g ctg ccc cag gac gac gtg gac atc atg gtg acc				1776
Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr				
580	585	590		
atc aac gat gtg cc ^g ggc tcc gtg aac gcc gtg gcc gtg gtc atc ccc				1824
Ile Asn Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val Ala Val Val Ile Pro				
595	600	605		
tg ^c atc ctg tcc ctc tg ^c atc ctg gtg ctg gtc tac acc atc ttc cag				1872
Cys Ile Leu Ser Leu Cys Ile Leu Val Leu Val Tyr Thr Ile Phe Gln				
610	615	620		
ttc aag aac aag aca gg ^c cct cag cct gtc acc tac tat aag cg ^g cca				1920
Phe Lys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro				
625	630	635	640	
gtc cag gaa tgg gtg tgagcagccc agagccctct ctatccactt ggtctggcca				1975
Val Gln Glu Trp Val				
645				
gccaggccct tcctcaccag ggtctgaggg gcagctctgg ccagtgctca ccagggccag				2035
cagggcccta ggctgggtc gtacagctga agttgtgggt gcattggcct aggctgagcg				2095

tggggcaggg aattatgggg gctgtgccca gggtggtgt ctggcaccca gctgccagcc 2155

ttctgtcctg ggcaaactac tccctactta aggaaatagg ccaggctcca tccggaggca 2215

gggaccatgc caggaggagc ccctgtggtc acggcatcct gtggtgtcca tgaggtacca 2275

cagctccact cctggctgga acccggcacc ctctgtggga agccagcact agctctcatc 2335

ccccatccgg gagataccac cagtcctggc cccctttgc caacacctgc tggtcagatg 2395

tccccctacc cccacccac tgtcctccaa ggctacagga cccctgcttc tgacacagtg 2455

agcaacaagg ctgggttcc ctgctggcag acggcagatc cctcaggaaa cctgctccac 2515

ttgtcagggt ctcttcggag acccaggatt tagggtcaca tgctgcaggc agggctgtgg 2575

cccagctggg tctgacaagg acccgtgtca catcgtaat attta 2620

<210> 9

<211> 21

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 9

GGTTCCCTCTT GTTCCACTTG G

21

<210> 10

<211> 35

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 10

gttaggaattc gggttgtagg gaggtcgaca ttgcc 35

<210> 11

<211> 23

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggcaatgtcg acctccctac aac 23

<210> 12

<211> 22

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 12

ggagctgtct aaggccatca ca 22

<210> 13

<211> 23

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 13

ctccctacaa cccgaattcc tac 23

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

cttgtggca gatagggggc

20

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

cgcgccgagg acctcagcct g

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gtttcccttt gttccacttg g

21

<210> 17

<211> 2295

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

aagagacaag aggtgccttg tggcagata ggggctggg agggggcctg cccggaagca 60

gtggtggccc gtggcaggct tctcaactggg taggaccggg ccctctgttg cacccttca 120

ccctgctctc tgccctcagg agtggctaag caggttcggt tacctgcccc cggctgaccc 180

cacaacaggg cagctgcaga cgcaagagga gctgtctaag gccatcacag ccatgcagca 240

gtttggtggc ctggaggcca ccggcatcct ggacgaggcc accctggccc tcatgaaaac 300

cccacgctgc tccctgccag acctccctgt cctgacccag gctcgagga gacgccaggc 360

tccagcccc accaagtggc acaagaggaa cctgtcggtt agggtccggc cgttcccacg 420

ggactcacca ctggggcacg acacggtgcg tgcactcatg tactacgccc tcaaggtctg 480

gagcgacatt gcgccttga acttccacga ggtggcgggc agcaccgccc acatccagat 540

cgacttctcc aaggccgacc ataacgacgg ctaccccttc gacgcccggc ggcaccgtgc 600

ccacgccttc ttccccggcc accaccacac cgccgggtac acccacttta acgatgacga 660

ggcctggacc ttccgctcct cggatgccc cggatggac ctgttgcag tggctgtcca 720

cgagtttggc cacgccattt ggttaagcca tgtggccgct gcacactcca tcatgcggcc 780

gtactaccag ggcccggtgg gtgacccgct gcgctacggg ctccctacg aggacaagg 840

gcgcgtctgg cagctgtacg gtgtgcggga gtctgtgtct cccacggcgc agccc gagga 900
gcctccctg ctgcccggagc ccccagacaa ccgggtccagc gccccgccc ggaaggacgt 960
gccccacaga tgcagcactc actttgacgc ggtggccca gatccgggtg aagctttctt 1020
cttcaaaggc aagtacttct ggcggctgac gcgggaccgg cacctgggtt ccctgcagcc 1080
ggcacagatg caccgcttct ggcggggcct gccgctgcac ctggacagcg tggacgccgt 1140
gtacgagcgc accagcgacc acaagatcgt ctctttaaa ggagacaggt actgggtgtt 1200
caaggacaat aacgttagagg aaggataccc gcgccccgtc tccgacttca gcctcccgcc 1260
tggcggcatc gacgctgcct tctcctggc ccacaatgac aggacttatt tctttaagga 1320
ccagctgtac tggcgctacg atgaccacac gaggcacatg gaccccggtt accccgccc 1380
gagccccctg tggaggggtg tccccagcac gctggacgcac gccatgcgtt ggtccgacgg 1440
tgcctcctac ttcttccgtg gccaggagta ctggaaagtg ctggatggcg agctggaggt 1500
ggcacccggg taccacagt ccacggcccg ggactggctg gtgtgtggag actcacaggc 1560
cgatggatct gtggctgcgg gcgtggacgc ggcagagggg ccccgccccc ctccaggaca 1620
acatgaccag agccgctcgg aggacggtt a cgaggtctgc tcatgcacct ctggggcatc 1680

ctctcccccggggccccaggcccaactgggtggctgccaccatgctgctgc tgctgccgcc 1740

actgtcacca ggcgccctgt ggacagcggccagccaggccctg acgctatgac acacagcg 1800

agcccatgaggacagaggaggctgggaca gcctggccac agagggcaag gactgtgccg 1860

gagtcctgg gggaggtgct ggccgggat gaggacgggc caccctggca ccggaaggcc 1920

agcagagggc acggcccgcc agggctggc aggctcaggt ggcaaggacg gagctgtccc 1980

ctagtgaggg actgtgttga ctgacgagcc gaggggtggc cgctccagaa gggtgcccg 2040

tcaggccgca ccgcccggcag cctcctccgg ccctggaggg agcatctcg gctggggcc 2100

caccctctc tgtgccggcg ccaccaaccc cacccacact gctgcctggt gctcccgcc 2160

gcccacaggg cctccgtccc caggtccccatggggcagccctccccaca gacgagcccc 2220

ccacatggtg ccgcggcacg tccccctgt gacgcgttcc agaccaacat gacctctccc 2280

tgctttgttag cggcc 2295

<210> 18

<211> 4014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (3148)..(3280)

<220>

<221> exon

<222> (3564)..(3633)

<400> 18

ttctgttggg gtgtccctgg caaactagga agtggttccc accctctcac tccagcccc 60

aagacggccc ctcccaggat gcctagcctg agatttgggg cacarcccct gagcacaaac 120

tcgtgttagg taggaggcac ccaccagccc tgccccacag acccaccacc ccccaagatt 180

cgatgccatt ctatgctcaa attccagtc ctcctgggc cacagggcac agtgcctgtt 240

tatcatgggc ggggctgcct gtcccggcct ggtgccgggg ccctggttct atgagttgaa 300

gcaggctggc cgctcacacc tgcaactaaa ccacctgctt ccaaacattg ggcaacattc 360

cacagccact gggagtgctg cctgccaggc ccggctccac tttcctgaaa tgcatgtggc 420

ctcgtggcca ggctgcccag ctccctgggg accagagtggtt ggggtgcccc aaaccgccc 480

cgtgaacccc acagagtaaa tggccactc agtgcagcta ccagccatga cctcagctta 540

tagacggaa ggctgggggg tgagttgtcc tcccaaggggg tctcagcacc tgctggcca 600

acccaggcag cagctggcct gggtgggaaa ggcacctgcc tgtgtggacc ctccctgggt 660

gagggggcag ggggtcatca tccaaatata tagatgtatgtt gagaaactc cagatgtttt 720

cctggaggag gtgacaggct attgttaacca tgaggcacag tggccctgtt gagctgtatgtt 780

cttaacaaag gactaaaaag tgcagaatgt gctgtatggc atctccagca cctacagcgg 840

tgactgtatca tgggacaccc tcagtaaacc ctgcagggtgc aaggtagtgtt gggaccggat 900

gctcggggcc aaagatcccc acaccctgga ggtcagggcg gaagtgggag gccagcttgt 960

caaggccaag gctgtcaccc ccaaggcccc tccagagaag ctgcccaccc cagtcatgaa 1020

cgtccacttt gacgtcctgt cgtgcctata gctttggagg ggcccccagt tctgtacaca 1080

ctcttggctt ccccaagggg ctgagggctt gggctgggtc agtagggttt ggaaaggggg 1140

taaaggcaca gaggggggccc ccgggaagga ctcagtgctt cctggaaggg gaatctcggg 1200

gtgtgcagat cccatgtatgtt gtcttgtagt gccccttcgtt gccagcacgs cctgttgctg 1260

atgcccctgg gacttccagg atgggtgggtc ctcattccctt ctgagcactg cctgctgkgt 1320

ggcaggagg gttggccagg accacccat caccagctcc tgcagaccag aacctggagg 1380

cccagcagggtt ggcataawtg agtcacaagc attttctttt ttcttttcc ttttttttt 1440

tttaggattt cttaaaaag ttatgtttttt ttcatttatg catttttta ggttaagcca 1500

catgaaacta ctatattttt tttaaatca gaaatggtca aaaatggca ctttcatatg 1560

atttggccaa tgaatacatg agaggtggta aataatagcg attcacaagc attttctaaa 1620

tgtccaggga aaaaaaaaaaag acaggtttgc aggcaaggca gagccccag cacatcaccc 1680

ctggcttgtta cctttctgga gcccgcctca cccctgctgt gttccctgg gctggcgagt 1740

atccacaggg cagagcagca gcttcatggc agcctgcaag tggcacagg cgccatttgg 1800

cggttgaaga aactgaagct aggggtggag gtatccccca cagatggcac ccaggcctgc 1860

catccccagg tccccacgat ggcacccagg tccccacaga tggcatccag gccccctgt 1920

ccccagggcc cctccagggt agcagagatg actggggcat gggccaggg ctgtatttat 1980

ccccaggtta aagggctgcc ctcattcctg ctcctactca gctccggtgt ggttagcctt 2040

gcacccaccc cagtggccccc tttagagcag agctgtcccc tgcgccaggt gctggtgtga 2100

acattttcca cgtcctggct cacgtcctca tcaccagcct gccaaggact ctgaggaagg 2160

agcccagagg ggtggactgc cttggcccaag gcacacagcg gggaggtggc tgagtggat 2220

ttgaacctag gcagcctggc tggaacctgg cttttgttc tgagacaggg tctcgctctg 2280

ttgcagacac agtctgcaac tcctgtgctc aaacgatcct cccgcctcag cttccaaag 2340

tgctgggatc tcaggcataa gccacacgac cggccaagcc tggctctta tctccccat 2400

gaatgtacag catggcccaa ttccttaaac tggtgtctga gccacagcct ttctcagctg 2460

gggtccccaga ccttggatgc tagacttccc tgtcacaagt cagctgagag cctgcatttgc 2520

acactggcca catttaagag cctttgaag gttccctagc atttgcggc ctcaggagc 2580

gtggggtgtgg gcaggggttgc catgagtggt tgtacaggtc gtgcacggca caagctcaca 2640

ccatctaagg gacatcagat ttatttatttt attcattttt tagatggagt cttgctctgt 2700

cgcgcaggct ggagtgcagt ggcacgatct cggctcactg caagctccgc ctcctgggtt 2760

cccaccaactc tcctgcytca gcctcccgag tagctggac tacaggcacc tgccaccaca 2820

cccggttaat ttttgtatt tttagtagag acggggtttc accatattag ctaggatggt 2880

ctccatctcc tgacctcatg atccgcctgc ctgcgcctcc caaactgctg ggattacagg 2940

cgtgagccac agcacccggc cagggacatc aggtttattt agacactttt ccggcagctg 3000

cccagggaag agacagagag gtgccttgc ggcagatagg gggctggag gggcctgcc 3060

cggaaggcgt gttggcccggt ggcaggcttc tcactggta ggaccggcc ctctgttgc 3120

ccccctcacc ctgctctctg ccctcaggag tggctaagca ggttcggta cctgcccccg 3180

gbtgacccca caacagggca gctgcagacg caagaggagc tgtctaaggc catcacagcc 3240

atgcagcgt ttktgtggcct ggaggchacc ggcattcctgg gtcagttctc cagggggcag 3300

cgggagcgcc gtgscccccgtcaggctctgc gcccgtcggccatgccccctctgatcaggc 3360

acagtcccgcttatgcttg aatgaacctggtcctggcc tggtgtagctcagagcctgg 3420

ggctggtccc ccaaagatgacgtgggagga gggsgcggctcgaggctgg tgccagagtc 3480

aggctcccgcccttggggat gctcgggatcctagggtggg gagtgagctggctc 3540

ttagctccat gcttccctg cagacgaggcaccttggccctgatgaaaa ccccacgctg 3600

ctccctgcca gacctccctgtcctgaccm caggtctcgc agggagacgc acaggctcm 3660

cagccccmm mcaagtggac acagagagga acctgtcgtaggtgggtgcgtggcagg 3720

gtgaggagcg gggcctccgtggaggtggsc gcgtggccag ggtgaggaac ggggtctccg 3780

tggaggtggg cgctggcca gggtgaaaa cgggtctccgtggaggcgggtcg 3840

agggtgagga acagggtctc cgtggaggtaggtggcgtggc cagggtgaaaa aacgggtct 3900

ccgtggaggc gggtgcgtggccaggtagtgggcccctgtctc cgtgtctggg 3960

cctgctgttagatcaagttatcgataaccgtcgacacctcaggggghccgtac 4014

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

aatctccat cggcccttca

21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

atgcacggcc accaggaaga

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

ggatcagaca acgatcgagt

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

cagcttgaag ttgtgcgtct

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ C12N9/64, 1/21, 15/57, C12P21/02, C12Q1/37,
 A61K38/57

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/02-9/94, 15/52-15/61

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Database MEDLINE on PubMed, Accession No. 99402951, Kajita, M. et al., "Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts.", FEBS Letters, Volume 457, Number 3, issued 3 September 1999, pages 353-356	1-32
A	Cancer Research, Volume 56, No. 5, issued 1 March 1996, Xose S. Puente et al., "Molecular Cloning of a Novel Membrane-type Matrix Metalloproteinase from a Human Breast Carcinoma", pages 944-949	1-32
P, A	Cancer Research, Volume 59, No. 11, issued 1 June 1999, Elena Llano et al., "Identification and Characterization of Human MTS-MMP, a New Membrane-bound Activator of Pro-gelatinase A Overexpressed in Brain Tumors", pages 2570-2576	1-32

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

• Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 24 December, 1999 (24.12.99)	Date of mailing of the international search report 11 January, 2000 (11.01.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05349

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 274, No. 13, issued 26 March 1999, Duangqing Pei, "Identification and Characterization of the Fifth Membrane-type Matrix Metallo- proteinase MT5-MMP", pages 8925-8932	1-32
A	EP, 875577, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION), 04 November, 1998 (04.11.98) & US, 5837508, A & JP, 10-313878, A	1-32
A	WO, 97/04080, A1 (FUJI YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 06 February, 1997 (06.02.97) & JP, 9-84589, A & JP, 9-87299, A & EP, 870826, A1	1-32
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 272, No. 15, issued 11 April 1997, Ken-ichi Shofuda et al., "Expression of Three Membrane-type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Characterization of MT3-MMPs with and without Transmembrane Domain", pages 9749 -9754	1-32
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 270, No 39, issued 29 September 1995, Takahisa Takino et al., "Identification of the Second Membrane-type Matrix Metalloproteinase (MT-MMP-2) Gene from a Human Placenta cDNA Library", pages 23013-23020	1-32
A	WO, 95/25171, A2 (MAXDELBRUCK-CENTRUM FUR MOLUKULARE MEDI- ZIN), 21 September, 1995 (21.09.95) & DE, 4438838, C1 & EP, 750671, A1 & JP, 10-501962, A	1-32
A	European Journal of Biochemistry, Volume 231, No. 3, issued 1 August 1995, Horst Will et al., "cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metallo- proteinase with a potential transmembrane segment", pages 602-608	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05349

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The requirement of unity of invention in international application (Rule 13.1 of the Regulations under the PCT) is not satisfied unless there is a technical relationship between a group of inventions as set forth in claims involving one or more of the same or corresponding special technical features. The term "special technical features" means technical features which clearly show the contribution to the prior art of the inventions as set forth in the claims as a whole (Rule 13.2 of the Regulations under the PCT). The requirement of unity of invention is judged without considering whether a group of inventions are described in separate claims or in a single claim in the alternative form (Rule 13.3 of the Regulations under the PCT).

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05349

Continuation of Box II of continuation of first sheet (1)

In the present case, inventions as set forth in claims 1 to 4, 9, 11, 13 to 16 (in claim 13, the part with citation of claims 9 and 11), 17 (the part with citation of claims 1 to 4), 18, 20 and 21 (the part with citation of claim 18), 22 (the part with citation of claim 1 to 4), 23, 25, 27, 29, 31 and 32 (the part with citation of claim 1 to 4) have a technical matter in common of MT4-MMP(2), while inventions as set forth in claims 5 to 8, 10, 12, 13 to 16 (in claim 13, the part with citation of claims 10 and 12), 17 (the part with citation of claim 5 to 8), 19, 20 and 21 (the part with citation of claim 19), 22 (the part with citation of claims 5 to 8) have another technical matter in common of MT5-MMP. However, it is needless to say that the transmembrane matrix metalloproteases (MT-MMP) have been publicly known. Thus, it can be concluded that there is no "special technical feature" between the inventions of the former group relating to MT4-MMP(2) and the inventions of the latter group relating to MT5-MMP.

Such being the case, the claims involve two inventions,
i.e.,

- ① inventions relating to MT4-MMP(2); and
- ② inventions relating to MT5-MMP.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N9/64, 1/21, 15/57, C12P21/02, C12Q1/37,
A61K38/57

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N9/02-9/94, 15/52-15/61

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Database MEDLINE on PubMed, Accession No. 99402951, Kajita, M. et al., "Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts.", FEBS Letters, Volume 457, Number 3, issued 3 September 1999, pages 353-356	1-32
A	Cancer Research, Volume 56, Number 5, issued 1 March 1996, Xose S. Puente et al., "Molecular Cloning of a Novel Membrane-type Matrix Metalloproteinase from a Human Breast Carcinoma", pages 944-949	1-32

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 12. 99

国際調査報告の発送日

11.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田俊生 印

4N 8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
P, A	Cancer Research, Volume 59, Number 11, issued 1 June 1999, Elena Llano et al., "Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-bound Activator of Pro-gelatinase A Overexpressed in Brain Tumors", pages 2570-2576	1-32
P, A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 274, Number 13, issued 26 March 1999, Duanqing Pei, "Identification and Characterization of the Fifth Membrane-type Matrix Metalloproteinase MT5-MMP", pages 8925-8932	1-32
A	EP, 875577, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 4.11月.1998 (04.11.98) & US, 5837508, A & JP, 10-313878, A	1-32
A	WO, 97/04080, A1 (FUJI YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 6.2月.1997 (06.02.97) & JP, 9-84589, A & JP, 9-87299, A & EP, 870826, A1	1-32
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 272, Number 15, issued 11 April 1997, Ken-ichi Shofuda et al., "Expression of Three Membrane-type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Rat Vascular Smooth Muscle Cells and Characterization of MT3-MMPs with and without Transmembrane Domain", pages 9749-9754	1-32
A	The Journal of Biological Chemistry, Volume 270, Number 39, issued 29 September 1995, Takahisa Takino et al., "Identification of the Second Membrane-type Matrix Metalloproteinase (MT-MMP-2) Gene from a Human Placenta cDNA Library", pages 23013-23020	1-32
A	WO, 95/25171, A2 (MAXDELBRUCK-CENTRUM FUR MOLUKULARE MEDIZIN) 21.9月.1995 (21.09.95) & DE, 4438838, C1 & EP, 750671, A1 & JP, 10-501962, A	1-32
A	European Journal of Biochemistry, Volume 231, Number 3, issued 1 August 1995, Horst Will et al., "cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment", pages 602-608	1-32

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件 (PCT規則13.1) は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的関係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである (PCT規則13.2)。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる (PCT規則13.3)。

そこで、請求の範囲をみると、請求の範囲1-4, 9, 11, 13-16 (請求の範囲1

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄の続き

3で請求の範囲9, 11を引用した部分), 17(請求の範囲1-4を引用した部分), 18, 20及び21(請求の範囲18を引用した部分), 22(請求の範囲1-4を引用した部分), 23, 25, 27, 29, 31及び32(請求の範囲1-4を引用した部分)の発明に共通する事項は、MT4-MMP(2)であり、請求の範囲5-8, 10, 12, 13-16(請求の範囲13で請求の範囲10, 12を引用した部分), 17(請求の範囲5-8を引用した部分), 19, 20及び21(請求の範囲19を引用した部分), 22(請求の範囲5-8を引用した部分), 24, 26, 28, 30, 31及び32(請求の範囲5-8を引用した部分)の発明に共通する事項は、MT5-MMPである。しかしながら、膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド(MT-MMP)はいうまでもなく公知のものであるから、前者の各発明(MT4-MMP(2)に関連する発明)と後者の各発明(MT5-MMPに関連する発明)とに共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

そうすると、請求の範囲には、
① MT4-MMP(2)に関連する発明、及び、
② MT5-MMPに関連する発明
の2発明が包含されている。